

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON EXTRACTOS DE MACROALGAS,
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*
CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA
AGUDA (AHPND/ EMS) EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.**

POR

Q.F.B. MARIBEL MALDONADO MUÑIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN NUTRICIÓN Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS PARA ORGANISMOS ACUÁTICOS**

FEBRERO, 2020

BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON EXTRACTOS DE MACROALGAS.
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*
CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA
AGUDA (AHPND/ EMS) EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

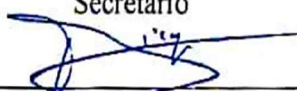
Comité de tesis



Dra. Lucia Elizabeth Cruz Suarez
Presidente



Dra. Martha Guadalupe Nieto López
Secretario



Dr. Denis Ricque Marie
Vocal



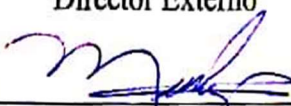
Dra. Mireya Tapia Salazar
Vocal



Dr. David Alonso Villarreal Cavazos
Vocal



Dr. Carlos Luna Criado
Director Externo



Dra. Raquel Mendoza Reséndez
Asesor Externo

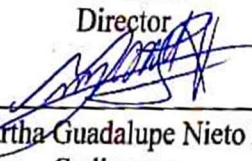
BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON EXTRACTOS DE MACROALGAS,
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*
CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA
AGUDA (AHPND/ EMS) EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

Dirección de tesis



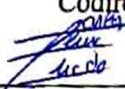
Dra. Lucia Elizabeth Cruz Suarez

Director



Dra. Martha Guadalupe Nieto López

Codirector



Dr. Carlos Luna Criado

Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Al gran equipo de trabajo del que formo parte encabezado por la Dra. Elizabeth Cruz, gracias por confiar en mí y asignarme nuevos retos con los cuales he adquirido experiencia de gran valor en el ámbito de la investigación y por darme la oportunidad de seguir formándome académica y profesionalmente; a las Dras. Martha Nieto y Mireya Tapia por el constante apoyo, dirección, paciencia y comprensión que me han brindado desde que llegue al laboratorio. Al Dr. Denis Ricque por su valiosa enseñanza y asesoramiento; al Dr. Julian Gamboa, Dr. David Villarreal y Lic. Adriana Garcia por su gran ayuda durante la elaboración de este proyecto.

A los Dres. Carlos Luna y Raquel Mendoza por su asesoría y siempre animarme a seguir adelante.

A los Dres. Sonia Soto Rodríguez y Bruno Gómez-Gil del CIAD Mazatlán por la donación de las cepas para la realización de este trabajo, por la capacitación y apoyo brindado.

Al CONACYT por el apoyo económico para la realización de este trabajo el cual fue parte del proyecto de Ciencia Básica No. Proyecto: 238458-2014.

A los Dres. Joseph Selvin y Seghal Kiran de la Universidad de Pondicherry, India por el interés sobre este proyecto, la enseñanza brindada y la generación de la oportunidad de colaboración por medio del FONCICYT-CONACYT No. Proyecto: 265613.

A la Empresa FITMAR por la donación de los organismos que se utilizaron en la parte experimental del proyecto.

A mis compañeros y amigos que fueron parte de este proceso: Diana Corral, Ana Muzquiz, Denisse Gonzalez, Ariel Robles, Ricardo Sánchez, Oscar Garcia y Myriam Dalias, gracias por el apoyo y por hacerlo divertido.

A Sarahy de Jesús Muñoz Medrano por tu valiosísima ayuda durante la etapa experimental de este proyecto, gracias por siempre apoyarme y ser más que mi familia.

DEDICATORIA

A mi hijo Aldo Haziél, gracias por ser mi inspiración y mi motor diario, por enseñarme a ser una mejor persona y por voltear mi mundo de cabeza para aprender a conectarme, a ti te dedico mi vida entera.

A mi compañero de vida Aldo Isaac, gracias por animarme a seguir siempre adelante, por el apoyo incondicional que siempre me das y por ser un motivo más para no rendirme, te amo.

A mis padres Serafín y María, gracias por su apoyo incondicional y por darme las bases con las cuales me han forjado en la persona que soy. ¡Gracias infinitas!

A Dios y a la vida por ponerme en el lugar y en el momento adecuado.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Cultivo de camarón	3
2.1.1. Principales retos del cultivo de camarón.....	4
2.1.2. Enfermedades bacterianas ocasionadas por el género <i>Vibrio</i> en cultivo de camarón .	4
2.1.3. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda	5
2.1.4. Tratamiento de enfermedades bacterianas en acuicultura	7
2.1.5. Desarrollo de tratamientos alternativos en acuicultura.....	8
2.2. Actividad anti- <i>Vibrio in vitro</i> de nanopartículas.....	9
2.3. Síntesis de nanopartículas de plata con extractos de macroalgas.....	10
2.4. Uso de alimentos adicionados con nanopartículas para control de enfermedades.....	12
2.5. Distribución, bioacumulación y cinética de depuración de nanopartículas administradas vía dietaria.....	13
2.6. Efecto de nanopartículas sobre histología de camarón	14
2.7. Influencia del consumo de dietas con AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas sobre la biodiversidad de la microbiota fecal de <i>L. vannamei</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS.....	17
5. OBJETIVO GENERAL.....	18
5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
6. MATERIAL Y METODOS.....	19
6.1. Reactivos.....	19
6.2. Origen de cepas.....	19
6.3. Algas marinas.....	20
6.3.1 Molienda	20

6.3.2 Identificación taxonómica de macroalgas	21
6.3.3 Análisis proximal	21
6.4. Obtención y caracterización de extractos.....	22
6.4.1. Extractos acuosos.....	22
6.4.2. Extractos hidroetanólicos.....	22
6.4.3. Cálculo de rendimiento de extractos	22
6.4.4. Cuantificación de compuestos fenólicos.....	23
6.4.5. Cuantificación de azúcares totales	23
6.4.6. Análisis estadístico.....	23
6.5. Síntesis de nanopartículas	24
6.5.1. Selección de nanopartículas	24
6.5.2. Purificación y cuantificación de Ag en nanopartículas.....	24
6.6. Caracterización de AgNPs	25
6.6.1. Barrido por espectroscopía UV-Visible	25
6.6.2. Composición estructural y morfología de partículas	25
6.6.3. Composición superficial	26
6.7. Actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	26
6.7.1. Método de difusión en disco	26
6.7.2. Ensayo de microdilución en placa	27
6.8. Preparación de alimento suplementado.....	28
6.8.1 Estimación de las pérdidas de AgNPs en dietas peletizadas (estabilidad en agua).....	28
6.9. Experimentos <i>in vivo</i>	28
6.9.1. Toxicidad aguda (7 días) y crónica (20 días).....	29
6.9.2. Distribución en tejido.....	29
6.9.3. Cinética de depuración <i>in vivo</i>	30
6.9.4. Efectos en histología	31
6.9.5. Desafío bacteriano.....	32
6.9.6. Evaluación sobre influencia del consumo de dietas con AgNPs sobre la biodiversidad de la microbiota fecal de <i>L. vannamei</i>	33
7. RESULTADOS.....	36
7.1. Confirmación de la identidad taxonómica y composición proximal de macroalgas.....	36
7.2. Rendimiento de extractos y caracterización.....	38
7.3. Síntesis de nanopartículas	40

7.3.1. Caracterización de nanopartículas.....	48
7.4. Actividad anti- <i>Vibrio in vitro</i> de nanopartículas.....	52
7.5. Estabilidad de AgNPs en alimentos suplementados	55
7.6. Ensayos de toxicidad aguda y crónica	55
7.7. Distribución de Ag en tejidos.....	57
7.8. Parámetros de depuración	60
7.9. Efectos en histología	61
7.10. Desafío bacteriano	65
7.11. Efecto del consumo de dietas adicionadas con AgNPs sobre la biodiversidad de la microbiota fecal de <i>L. vannamei</i>	68
8. DISCUSIÓN	71
8.1. Composición proximal de algas.....	71
8.2. Rendimiento y caracterización de extractos.....	71
8.3. Síntesis de AgNPs.....	72
8.4. Caracterización de AgNPs con mejor actividad antibacteriana	73
8.4. Actividad antibacteriana	74
8.5. Estabilidad de alimentos adicionados con AgNPs	75
8.6. Toxicidad aguda y crónica	75
8.7. Bioacumulación y depuración de AgNPs	76
8.8. Efecto de AgNPs sobre histología de camarón	77
8.9. Protección de alimentos adicionados con AgNPs contra desafíos bacterianos Vp AHPND+	78
8.10. Efecto de AgNPs sobre microbiota intestinal de camarón.....	78
9. CONCLUSIONES	80
10. REFERENCIAS	81
ANEXO 1	93
ANEXO 2	98
11. RESUMEN BIOGRÁFICO	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales enfermedades de camarón cultivado (Soto-Rodriguez 2019)	4
Tabla 2. Enfermedades ocasionadas por bacterias del género <i>Vibrio</i> (Gomez-Gil <i>et al.</i> 2001)	5
Tabla 3. Actividad anti- <i>Vibrio in vitro</i> de nanopartículas de plata	10
Tabla 4. Nanopartículas metálicas sintetizadas a partir de algas verdes, rojas y cafés	11
Tabla 5. Evaluación de alimentos adicionados con nanopartículas para control de enfermedades	13
Tabla 6. Cepas de <i>Vibrio</i> evaluadas	19
Tabla 7. Tratamientos evaluados durante ensayo infeccioso	32
Tabla 8. Diseño experimental de ensayo	34
Tabla 9. Composición proximal de harina de macroalgas (%)	38
Tabla 10. Concentración de Ag en las soluciones de AgNPs purificadas.....	40
Tabla 11. Concentraciones de Ag en dietas experimentales y en agua después de la lixiviación (medias \pm desviación estándar, n=3).....	55
Tabla 12. Rendimiento de crecimiento de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados durante 7 días con dietas peletizadas suplementadas con dosis nominales de AgNPs (de 0 a 10 000 mg de Ag por kg de alimento, \pm desviación estándar, n=3).....	56
Tabla 13. Rendimiento de crecimiento de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados durante 20 días con dietas peletizadas suplementadas con dosis nominales de AgNPs (de 0 a 1 000 mg de Ag por kg de alimento, \pm desviación estándar, n=3).....	58
Tabla 1.A1. Primers utilizados para la amplificación de <i>V. parahaemolyticus</i> toxigénico.	94
Tabla 2.A1. Controles para PCR.....	94
Tabla 3.A1. Soluciones y cantidades utilizadas en la preparación de la mezcla maestra para PCR	94
Tabla 4.A1. Soluciones y cantidades utilizadas en la preparación de la mezcla maestra para qPCR	96
Tabla 1.A2. Cantidades utilizadas en la preparación de la mezcla para PCR.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación del consumo de especies de importancia alimenticia obtenidas por captura vs acuicultura (FAO 2018)	3
Figura 2. Producción de camarón en Latinoamérica 2008-2015	6
Figura 3. Disección de órganos internos de camarón <i>L. vannamei</i> sano (C y D) vs camarón con AHPND (A y B) durante la fase aguda de la enfermedad. Fuente: (Tran <i>et al.</i> 2013)	7
Figura 4. Área de colecta de macroalgas pardas en La Escalera, Península de Baja California, México	21
Figura 5. Lay-out de llenado de caja Petri durante ensayos de antibiograma; (-) control negativo agua destilada, (+) control positivo AgNO ₃ , AgNPs (A, B o C) soluciones de nanopartículas... ..	27
Figura 6. Condiciones experimentales de ensayo de metagenómica, a) jaulas individuales, b) bloque compuesto por jaulas distribuidos aleatoriamente, c) heces por colectar, d) manejo de organismos durante alimentación y recambio.....	35
Figura 7. Confirmación de género y especie de algas pardas, (i) clave taxonómica, (ii) especie entera, (iii) húmeda y (iv) troceada previo a la molienda, a) <i>Ecklonia arborea</i> (Areschoug 1876), b) <i>Egregia menziesii</i> (Turner) (Areschoug 1876), c) <i>Silvetia compressa</i> (J. Agardh) (De Toni 1985), d) <i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) (C. Agardh 1820), e) <i>Pterygophora californica</i> (Ruprecht, 1852), f) <i>Cystoseira osmundacea</i> (Turner) (C. Agardh 1820).....	37
Figura 8. a) Rendimiento (% o g de extracto por cada 100 g de alga en BS) obtenido en extractos acuosos e hidroetanólicos y su contenido de b) polisacáridos (% o g equivalentes a fucosa por cada 100 g de extracto en BS) y c) compuestos fenólicos totales (CFT) (% o g equivalentes a floroglucinol por cada 100 gr de extracto BS	39
Figura 9. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga <i>Ecklonia arborea</i> y AgNO ₃ inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula obtenido	41
Figura 10. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga <i>Silvetia compressa</i> y AgNO ₃ inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula	42
Figura 11. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga <i>Cystoseira osmundacea</i> y AgNO ₃ inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado.....	43
Figura 12. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga	

<i>Pterygophora californica</i> y AgNO ₃ inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado.....	44
Figura 13. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga <i>Ulva clathrata</i> y AgNO ₃ inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado.....	45
Figura 14. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga <i>Macrocystis pyrifera</i> y AgNO ₃ inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado.....	46
Figura 15. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga <i>Egrelia menziesii</i> y AgNO ₃ inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado.....	47
Figura 16. Patrón XRD de AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de <i>U. clathrata</i> los picos de difracción coinciden con las posiciones de referencia de estructuras cúbicas centradas en la cara de AgCl (círculos) o Ag metálica (diamantes).....	48
Figura 17. a) Imagen TEM representativa de AgNPs sintetizadas con extracto acuoso de <i>Ulva</i> . La imagen de inserción muestra la distribución de tamaño relacionada. La línea roja continua corresponde al mejor ajuste de distribución log-normal. b) Patrón SAED donde se indican las posiciones esperadas de los anillos de difracción asociados a los planos cristalográficos de plata metálica fcc (JCPDS 04-0783) y cloruro de plata (JCPDS 31-1238). c) Imagen HRTEM de AgNPs menor a 15 nm d) Imagen FFT del área resaltada en cuadro amarillo.....	50
Figura 18. Espectros FTIR de a) extracto acuoso de <i>Ulva clathrata</i> y b) AgNPs sintetizadas con el extracto de <i>Ulva clathrata</i>	51
Figura 19. Espectros Raman del extracto de <i>U. clathrata</i> (línea punteada) y AgNPs (línea continua)	51
Figura 20. Actividad antibacteriana de AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas mediante difusión en disco Kirby-Bauer, mm de inhibición ± error estándar, y el valor promedio por tratamiento (\bar{x}) obtenidos a 1 µg de AgNPs por disco (H: extracto hidroetanólico; A: extracto acuoso). Las letras en superíndice representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de comparación de medias múltiple de Tukey.....	53
Figura 21. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante microdilución en placa de AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas mexicanas (H: extracto hidroetanólico; A: extracto acuoso), y el valor promedio por tratamiento (\bar{x}). Las letras en superíndice representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de	

comparación de medias múltiple de Tukey.....	54
Figura 22. Gráfico de cajas de índice hepatosomático (IPH) después del consumo durante 7 días de alimentos suplementados con AgNPs (de 0 a 1 000 mg de Ag por kg ⁻¹ de alimento). La línea blanca representa el valor promedio de IPH, las letras en la parte superior de los cuadros medios indican la ausencia (a) o presencia (b) de una diferencia significativa para el grupo de control (prueba de Dunnet)	56
Figura 23. Gráfico de cajas de índice hepatosomático (IPH) después del consumo durante 20 días de alimentos suplementados con AgNPs (de 0 a 1 000 mg de Ag por kg ⁻¹ de alimento). La línea blanca representa el valor promedio de IPH	58
Figura 24. Bioacumulación de Ag en tejidos de camarones en a) hepatopáncreas, b) cutícula de cefalotórax y c) músculo, después del consumo durante 7 días de alimentos suplementados con AgNPs (de 0 a 10 000 mg de Ag por kg ⁻¹ de alimento). Las letras en la parte superior de las barras de las columnas indican diferentes subconjuntos homogéneos según lo determinado por una prueba de comparación de medias múltiples de Tukey; las barras de error representan la SD en todas las figuras.....	59
Figura 25. Cinética del modelo de depuración ln (concentración) del contenido de Ag en branquias y hepatopáncreas.....	60
Figura 26. Disección de tractos digestivos completos de organismos a los días 5, 10, 15 y 20 de alimentación con alimentos suplementados con AgNPs (de 0 a 10 000 mg de Ag por kg ⁻¹ de alimento)	61
Figura 27. Microfotografía de hepatopáncreas (HP) de camarón <i>L. vannamei</i> al día 0 de alimentación con la dietas experimental. a. y b. Corte de túbulos del HP, donde se observa reducción de vacuolas en células R. c. Túbulos de HP donde se muestra un epitelio adelgazado ausente de vacuolas y formación de estructuras vermiformes (flecha) en el lumen de algunos túbulos. Tinción hematoxilina eosina-floxina (H&E).....	62
Figura 28. Microfotografía de hepatopáncreas (HP) de camarón <i>L. vannamei</i> al día 20 de alimentación con las dietas experimentales (0, 10, 100 y 1000 ppm de AgNPs). a. Tratamiento control con 0 ppm de AgNPs; b. Tratamiento con 10 ppm de AgNPs; c. Tratamiento con 100 ppm de AgNPs; d. T Tratamiento con 1000 ppm de AgNPs. Tinción H&E	64
Figura 29. Prevalencia (%) de observaciones histológicas de hepatopáncreas (HP) de camarón <i>L. vannamei</i> al día 20 de alimentación con las dietas experimentales (0, 10, 100 y 1000 ppm de AgNPs).....	65
Figura 30. Organismos <i>L. vannamei</i> sobrevivientes y sus tractos digestivos disectados a las 108 hpi al término del ensayo infeccioso con un inóculo de 10 ⁹ UFC ml ⁻¹ de Vp M9-04 AHPND+. 67	
Figura 31. Análisis de la sobrevivencia por Kaplan-Meier de organismos <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas adicionadas con 0, 10 y 100 ppm de AgNPs y una dieta comercial (TEST) desafiados con Vp M9-04 AHPND+. Los valores entre paréntesis representan la sobrevivencia (%) ±SD, las letras representan diferencias significativas entre tratamientos estimados por el análisis Holm-Sidak (P<0.001)	68
Figura 32. Abundancia relativa de OTUs a nivel genero de microbioma de fecal promedio de organismos <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas suplementadas con AgNPs (0, 10 y 100 ppm).	

D07: aclimatación, D14: exposición, D21: depuración	69
Figura 33. Abundancias relativas OTUs a nivel especie de microbioma de fecal promedio de organismos <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas suplementadas con AgNPs (0, 10 y 100 ppm). D07: aclimatación, D14: exposición, D21: depuración	69
Figura 34. Diversidad en el microbioma fecal (índice de Shannon) de organismos <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas suplementadas con AgNPs (0, 10 y 100 ppm).....	70
Figura 35. Comparaciones de proporciones a nivel orden por tratamiento de muestreo. a) 0 vs 10 ppm, b) 0 vs 100 ppm	70
Figura 1.A1. Electroforesis de los amplicones AP1 CIAD y AP2. Marcador Kapa Express ladder.	96

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AAS	Espectroscopía de absorción atómica
AgNPs	Nanopartículas de plata
AHPND	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease o Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda
AHPND+	Causante de Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda
ANOVA	Análisis de Varianza
BS	Base seca
CFT	Contenido de compuestos fenólicos
CIAD	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C
ELN	Extracto libre de nitrógeno
EMS	Early Mortality Syndrome o Síndrome de Mortalidad Temprana
FGE	Equivalentes de florogucinol
HP	Hepatopáncreas
hpi	Horas post-infección
IPH	Índice hepatosomático
IZ	Zona de Inhibición
MH	Caldo Mueller-Hinton
OTUs	Unidad taxonómica operativa o Operative Taxonomic Unit
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa o Polimerase Chain Reaction
PMS	Perdida de Materia Seca (%)
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Sobrevivencia (%)
TC	Tasa de crecimiento
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
TSB	Tryptisoya broth (caldo soya tripticaseína)
UE	Unidad experimental
Vp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

RESUMEN

La producción de camarón por acuicultura es una actividad económica de gran importancia en México. Las enfermedades ocasionadas por el género *Vibrio* causan grandes pérdidas en esta actividad. En 2013, la producción del país se redujo hasta en un 60%, debido a la aparición de la *Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas* (AHPND por sus siglas en inglés), la cual es ocasionada por cepas de *Vibrio*. Desafortunadamente, hoy en día el uso de antibióticos en acuicultura para el control de este y otros patógenos se encuentra restringido en la mayoría de los países, por lo cual surge la necesidad de desarrollar tratamientos alternativos que ayuden a minimizar las pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades emergentes. Las nanopartículas de plata (AgNPs) son conocidas por sus ya demostradas actividades antibacterianas, antivirales, y antifúngicas. Esto, ha provocado un aumento sobre su investigación y posible aplicación como agente terapéutico en el sector acuícola. Sin embargo, hoy en día los estudios realizados sobre este tema en camarón son incipientes.

En este trabajo de investigación se ha evaluado la efectividad de AgNPs sintetizadas a base de dos tipos de extractos (acuosos y etanólicos) de 7 especies de algas marinas mexicanas (*U. clathrata*, *S. compressa*, *C. osmundacea*, *E. arborea*, *P. californica*, *E. menziesii* y *M. pyrifera*) como agente antimicrobiano contra 7 cepas de *Vibrio* de importancia acuícola (3 de ellas causantes de AHPND); de las 14 reacciones propuestas, 7 dieron productos estables, entre los cuales las AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de *U. clathrata* fueron las que mostraron estadísticamente mejor actividad antibacteriana *in vitro* contra las cepas de *Vibrio*; en consecuencia estas AgNPs fueron seleccionadas para su posterior caracterización y estudios *in vivo*. Los estudios de caracterización cristalográfica mostraron que las AgNPs estaban conformadas por fases cristalinas de Ag y AgCl estabilizadas con moléculas de proteínas, polisacáridos y polifenoles contenidos en el extracto del alga; además presentaron una morfología esférica-irregular con un tamaño promedio de 9.5 nm. Para su estudio *in vivo* estas AgNPs fueron suplementadas en una dieta comercial por aspersión; las AgNPs mostraron una buena estabilidad y adherencia registrando pérdidas por lixiviación menores al 5(%).

Experimentos llevados a cabo en juveniles de *Litopenaeus vannamei* demostraron que el consumo a corto plazo (7 días) de alimentos peletizados suplementados con dosis nominales de AgNPs (10, 100, 1 000 o 10 000 mg de Ag kg⁻¹ de alimento o ppm), no afecta parámetros de sobrevivencia, crecimiento o tasa de conversión alimenticia de los camarones; sin embargo, altas concentraciones dietarias (1 000 y 10 000 ppm) disminuyen significativamente el índice hepatosomático (IPH). En contraste, cuando se administran estos alimentos durante un tiempo más prolongado (20 días) se observan efectos significativos sobre la ganancia en peso (mayor rendimiento con las dosis de 10 y 100 ppm y menor rendimiento con 1 000 ppm) pero no se muestran efectos sobre el IPH, sin embargo, si se muestran efectos negativos sobre la histología del hepatopáncreas a partir de esta dosis (1000 ppm), por lo cual su consumo debe restringirse por debajo de los 100 ppm.

Por otra parte, el consumo a corto plazo de AgNPs produjo una bioacumulación significativa de Ag dependiente de la dosis en el hepatopáncreas seguido de la cutícula, mientras que la bioacumulación en el músculo no fue significativa. El estudio de depuración mostró que la asimilación y depuración de Ag es llevada a cabo en mayor parte por el hepatopáncreas. Se demostró la efectividad de los alimentos adicionados con AgNPs para proteger contra Vp AHPND+ ya que el consumo de alimentos suplementados con AgNPs durante 7 días aumentó significativamente la sobrevivencia en organismos *Litopenaeus vannamei* desafiados por baño con *Vibrio parahaemolyticus* AHPND⁺ (sobrevivencias respectivas de 78% y 27% para los alimentos 100 ppm y control). Finalmente, se encontró que el consumo de AgNPs por la vía dietaria no afecta significativamente la diversidad del microbioma fecal en los organismos (índice de Shannon); además se encontró que *Vibrio*, *Photobacterium* y *Pseudoalteromonas* fueron los géneros con mayor abundancia en las muestras.

ABSTRACT

The shrimp production by aquaculture is an economic activity of great importance in Mexico. The diseases caused by the genus *Vibrio* are responsible for great losses in this activity. In 2013, the country's production was reduced by up to 60%, due to the appearance of Acute Hepatopancreas Necrosis Disease (AHPND), which is caused by *Vibrio* strains. Actually, the use of antibiotics in aquaculture for the control of this and other pathogens is restricted in most countries, so there is a need to develop alternative treatments that help to minimize economic losses caused by emerging diseases. Silver nanoparticles (AgNPs) are known for their antibacterial, antiviral, and antifungal activities. This has led to an increase in their research and possible application as a therapeutic agent in the aquaculture sector. However, today studies on this subject in shrimp are incipient.

In this research the effectiveness of synthesized AgNPs has been evaluated based on two types of extracts (aqueous and ethanolic) of 7 species of Mexican seaweeds (*U. clathrata*, *S. compressa*, *C. osmundacea*, *E. arborea*, *P californica*, *E. menziesii* and *M. pyrifera*) as an antimicrobial agent against 7 *Vibrio* strains of aquaculture importance (3 of them causing AHPND); of the 14 reactions proposed, 7 gave stable products, among which the AgNPs synthesized with the aqueous extract of *U. clathrata* were the ones that showed statistically better antibacterial activity against *Vibrio* strains *in vitro*; consequently these AgNPs were selected for subsequent characterization and *in vivo* studies. Crystallographic characterization studies showed that AgNPs were formed by crystalline phases of Ag and AgCl stabilized with protein molecules, polysaccharides and polyphenols contained in the algae extract; moreover, they presented a spherical-irregular morphology with an average size of 9.5 nm. For their *in vivo* study, these AgNPs were sprayed on a commercial diet; the AgNPs showed good stability and adherence, registering leaching losses lower than 5 (%).

Experiments carried out in juveniles of *L. vannamei* demonstrated that short-term (7 days) consumption of pelletized feeds supplemented with nominal doses of AgNPs (10, 100, 1000 or 10 000 mg of Ag kg⁻¹ of food or ppm) does not affect parameters of survival, growth or food conversion rate of shrimp; however, high dietary concentrations (1 000

and 10 000 ppm) significantly decreased the hepatosomatic index (HPI). In contrast, when these diets are administered for a longer time (20 days), significant effects on weight gain are observed (higher yield with the dose of 10 and 100 ppm and lower yield with 1 000 ppm), and no effects on HPI are shown; however, negative effects on hepatopancreas histology are shown from this dose (1000 ppm and higher); therefore its consumption should be restricted over 100 ppm.

On the other hand, short-term consumption of AgNPs produced a significant dose-dependent Ag bioaccumulation in the hepatopancreas followed by the cuticle, while bioaccumulation in the muscle was not significant. The purification study showed that the assimilation and purification of Ag is carried out mostly by the hepatopancreas. The effectiveness of foods added with AgNPs to protect against Vp AHPND⁺ was demonstrated after 7 days of consumption of AgNPs supplemented feed increased significantly the survival of *L. vannamei* organisms challenged with *Vibrio parahaemolyticus* AHPND⁺ (survival rates of 78 and 27% for the 100 ppm and control diets respectively). Finally, the consumption of AgNPs via diet does not affect the diversity of the fecal microbiome in organisms (Shannon index); *Vibrio*, *Photobacterium* and *Pseudoalteromonas* were the genera with greater abundance in the samples.

1. INTRODUCCIÓN

La industria del cultivo de camarón es una de las actividades económico-productivas del sector acuícola más importantes a nivel mundial. Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta son las enfermedades emergentes ocasionadas por bacterias, virus y parásitos, siendo las de origen bacteriano la principal causa de mortalidad. (Aguirre-Guzmán *et al.* 2004). La *Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)* denominada anteriormente como *Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS)* es ocasionada por cepas de *Vibrio* y se caracteriza por producir una disfunción o lisis del hepatopáncreas y mortalidades de hasta el 90(%), esta enfermedad ha ocasionado grandes pérdidas en la industria de camarón en diversos países asiáticos en donde fue detectada por primera vez, años más tarde esta enfermedad ha sido trasladada a México, uno de los principales exportadores de camarón a nivel mundial donde el 71 (%) de la producción proviene de acuicultura (Gomez-Gil *et al.* 2014; Yang *et al.* 2014).

El uso de antibióticos para controlar las cepas de *Vibrio* en la acuicultura de camarón se encuentra restringido en la mayoría de los países (Krishnamoorthy *et al.* 2014; OIE, 2014), debido a que en los últimos años el uso desmedido de antibióticos sintéticos para contrarrestar estas y otras enfermedades ha causado cambios no solo a nivel medio ambiental, sino también en las comunidades bacterianas, las cuales a su vez han desarrollado resistencia a estos compuestos haciendo cada vez más difícil el tratamiento de dichas enfermedades. Por esta razón, el desarrollo e investigación de antimicrobianos alternativos “verdes” o amigables con el medio ambiente, ha tomado auge durante la última década. La nanotecnología mediante la nano-estructuración de compuestos naturales puede ofrecernos materiales con características particulares pueden ayudar al tratamiento de este tipo de enfermedades (Rai *et al.* 2009; Swain *et al.* 2014; Chinnappan *et al.* 2015; Sivaramasamy and Zhiwei 2016). El uso de nanopartículas metálicas sintetizadas a partir de recursos marinos como un aditivo antibacteriano en los alimentos para camarón podría ser una alternativa viable de tratamiento. Sin embargo, la aplicación de las nanopartículas en la acuicultura es reciente y por ello existen múltiples interrogantes sobre su utilización, una de ellas es su toxicidad. Actualmente, existen pocos

estudios que determinen dosis efectivas para el control de enfermedades bacterianas y en los cuales se defina la mejor forma de administración, así como su tasa de acumulación y depuración, y su impacto sobre los consorcios bacterianos dentro del tracto gastrointestinal de los organismos a los que se les administra. En este trabajo de investigación se presentan los resultados generados en cuanto a: 1) síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) basadas en extractos de macroalgas Mexicanas, 2) evaluación antibacteriana *in vitro* contra cepas de *Vibrio*, 3) estandarización de la inclusión de nanopartículas en dietas peletizadas y evaluación de su estabilidad, y 4) el efecto del consumo de estos alimentos en: sobrevivencia de camarones desafiados, microbioma fecal, histología, toxicidad, bioacumulación y depuración en diferentes tejidos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cultivo de camarón

Los crustáceos destacan entre los productos alimenticios acuáticos, no sólo por su alto valor nutritivo, sino también, por constituir un platillo exquisito de consumo cada vez más elevado; entre ellos, los camarones peneidos destacan por poseer un gran potencial para el cultivo; su alta demanda y la imposibilidad de aumentar su producción por los medios tradicionales de captura, han convertido al cultivo de camarón en una importante actividad económica para algunos países. Debido a esto, los productores de esta y otras especies de importancia alimenticia destinan una mayor cantidad de recursos para aumentar su producción por medio de cultivo, de tal manera que en la actualidad el 53(%) de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación son producidos por acuicultura (FAO 2018).

Fish consumption: Capture fisheries vs aquaculture

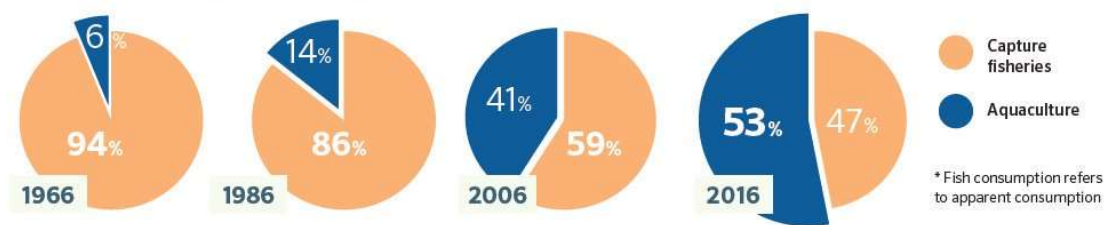


Figura 1. Comparación del consumo de especies de importancia alimenticia obtenidas por captura vs acuicultura (FAO 2018)

Dentro de la producción mundial de camarón, México se encuentra enlistado en el séptimo lugar, posicionándose dentro de los principales exportadores a mercados internacionales importantes como: Estados Unidos de América, Vietnam y Francia; en 2017 esta actividad provocó una derrama económica de 452 millones de dólares solo por exportaciones. (CONAPESCA, 2017). La producción de camarón en México presenta una tasa media de crecimiento anual de 1.59 (%) entre el 2008 y el 2018, pasando de 196,300 a 229,800 toneladas, respectivamente, en este mismo año la producción nacional del crustáceo alcanzó un nuevo máximo histórico con un 71(%) proveniente de acuicultura y 29 (%) de captura. Sinaloa, Sonora y Nayarit destacan por ser los principales estados productores con el 70(%) del área de cultivo y 90(%) de la producción total del país (<https://www.>

jornada.com.mx/ ultimas/ politica/2019/02/14 /industria-del- camaronfundamental -para-economia-de-mexico-2788.html).

De las especies de camarón presentes en México la más relevante es *Litopenaeus vannamei* (Bone, 1931) o también llamado camarón blanco del pacífico, hoy en día es la que mayormente se cultiva debido a su alta resistencia a enfermedades y rápido crecimiento (CONAPESCA, 2017).

2.1.1. Principales retos del cultivo de camarón

Sin embargo, las estadísticas no siempre son positivas existen riesgos a los que el cultivo de camarón está expuesto en cada ciclo de producción, debido a que estos organismos cuentan con un sistema inmune limitado las enfermedades emergentes de origen viral, parasitario, y bacteriano son causantes de grandes pérdidas económicas. Actualmente, las principales enfermedades que se presentan en el cultivo de camarón y que más impactan su producción son AHPND seguido de virus de macha blanca y vibriosis, ver Tabla 1 (Soto-Rodriguez 2019). La prevención y control de estas enfermedades en la producción camaronera se ha vuelto prioridad para una producción camaronícola ecológica y económicamente viable.

Tabla 1. Principales enfermedades de camarón cultivado (Soto-Rodriguez 2019)

Patógeno	Enfermedad	Impacto México
Virus	Virus de la mancha blanca (WSSV)	+++
	Virus del taura (TSV)	++
	Síndrome d cabeza amarilla (YHV)	?
	Micronecrosis (IMNV)	n.d.
	CMNV: Mortalidad encubierta	n.b.
	Necrosis hipodérmica y hematopoyética (IHHNV)	+
	Baculovirus (BP)	+
Bacterias	AHPND	++++
	Vibriosis	++
	Hepatopancreatitis necrotizante NHP-B	++
Parásitos	EHP: <i>Enteritozooanhepatopeni</i>	n.b.

+: grado de impacto; ?: sospecha, n.d.: no detectado; n.b. no buscado

2.1.2. Enfermedades bacterianas ocasionadas por el género *Vibrio* en cultivo de camarón

La mortalidad de camarón originada por este grupo de bacterias gram negativas puede

variar desde intervalos insignificantes hasta presentar mortalidades del 100(%), estas bacterias se han registrado a menudo como patógenas oportunistas, afectando principalmente en la fase de larvicultura (postlarvas) como en la engorda (juveniles). En cada una de estas etapas algunos *vibrios* se han perfilado como más frecuentes, de esta manera se ha reconocido la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela*, (anteriormente clasificada como *V. damsela*) principalmente en estanques de engorda, así como *V. harveyi* y *V. splendidus* que se han detectado mayormente en el cultivo larvario, ocasionando enfermedades características por etapa, ver Tabla 2. Los signos clínicos presentes durante una vibriosis son: necrosis, septicemia, opacidad de los músculos, falta de apetito y/o tracto intestinal vacío, debilidad, malformaciones y melanización (Gomez-Gil *et al.* 2001; Aguirre-Guzmán *et al.* 2004).

Tabla 2. Enfermedades ocasionadas por bacterias del género *Vibrio* (Gomez-Gil *et al.* 2001)

Engorda	Larvicultura
Camarón manchado (Brown spot)	Bacterias luminiscentes
Astilla negra (Black splinter)	Bolitas blancas
Síndrome gaviota (vibriosis sistémica)	Síndrome Zoea II
Epibiontes bacterianos	Epibiontes bacterianos
Vibriosis luminiscente	
Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)	

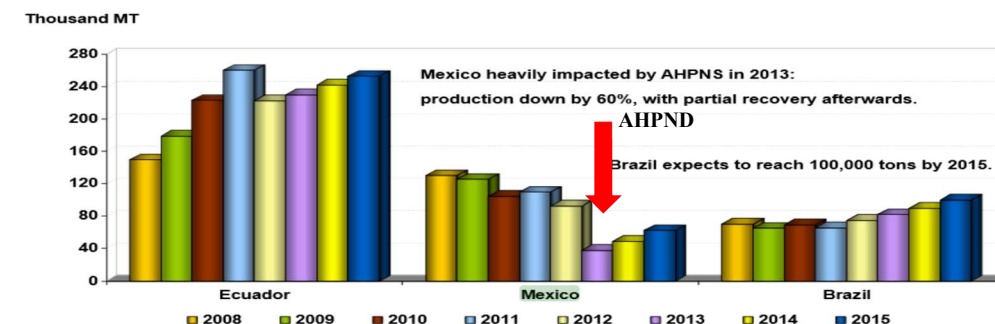
2.1.3. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

2.1.3.1. Origen y distribución

Durante el año 2009, en el continente asiático (China, Tailandia, Vietnam y Malasia) surgió la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda conocida como AHPND por sus siglas en inglés y denominada inicialmente como síndrome de la mortalidad temprana (EMS), debido a que su agente causal era desconocido y que producía mortalidades masivas durante los primeros treinta días de cultivo. En el 2013 se confirma la presencia de AHPND en México, durante en este año la producción de camarón en el país se redujo significativamente hasta un 60(%), es decir, paso de 95 mil toneladas a casi 50 mil toneladas provocando pérdidas millonarias para la industria camaronera, ver Figura 2.

Esta enfermedad también ha afectado la producción de camarón en países como: USA, Belice, Australia y Filipinas (Coutteau and Goossens 2013; Nunan *et al.* 2014; Han *et al.* 2015; Soto-Rodriguez *et al.* 2015; Soto-Rodriguez 2019).

Shrimp Aquaculture in Latin America: 2008 – 2015 Major Producers



Sources: FAO (2013) for 2008-2011; GOAL (2013) for 2012-2015.

Figura 2. Producción de camarón en Latinoamérica 2008-2015

2.1.3.2. Agente causal y etiología de la enfermedad

Esta enfermedad emergente ha sido denominada por la OIE en 2017 como “una nueva infección que resulta de la evolución o cambio de un patógeno existente que resulta en un cambio del huésped, vector, patogenicidad o cepa”. La AHPND es ocasionada por cepas de *V. parahaemolyticus*, aunque recientemente se ha reportado que también puede ser ocasionada por cepas de *V. campbellii* (Cepa KC13.17.5 reportada en Vietnam) y *V. owensii* (Cepa SH14 reportada en China); en general, estas cepas son portadoras de un plásmido (~70-kbp) con genes que codifican homólogos de una toxina lítica binaria (PirA y PirB) altamente estable en agua (Kondo *et al.* 2015; Liu *et al.* 2015; Soto-Rodriguez *et al.* 2015); estas cepas contienen un perfil bioquímico, morfológico y fisiológico similar que las cepas inocuas, son colonias verdes en TCBS y poseen amplio rango de tolerancia a la temperatura (20-44 °C), salinidad (0.05-100 ppm NaCl) y pH (4-10), todas las cepas *V. parahaemolyticus* son (PCR tlh+, trh-), AP3 + (qPCRtlh+), AP4 + (qPCR tlh+) y son color malva en ChromAgar (Soto-Rodriguez 2019).

Estas cepas de *Vibrio* se introducen vía oral colonizando el tracto digestivo, produciendo una toxina en el hepatopáncreas, la cual provoca durante la fase aguda de la enfermedad una disfunción de las células de este órgano el cual se torna decolorado, atrofiado y

acuoso, provoca anorexia, letargia y cromatóforos expandidos, tracto vacío (estómago e intestino) ver Figura 3, la mortalidad puede llegar al 100(%) en los estanques afectados; el camarón tigre *Penaeus monodon* así como el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* son las especies más susceptibles a esta enfermedad (Tran *et al.* 2013; Soto-Rodriguez 2019).

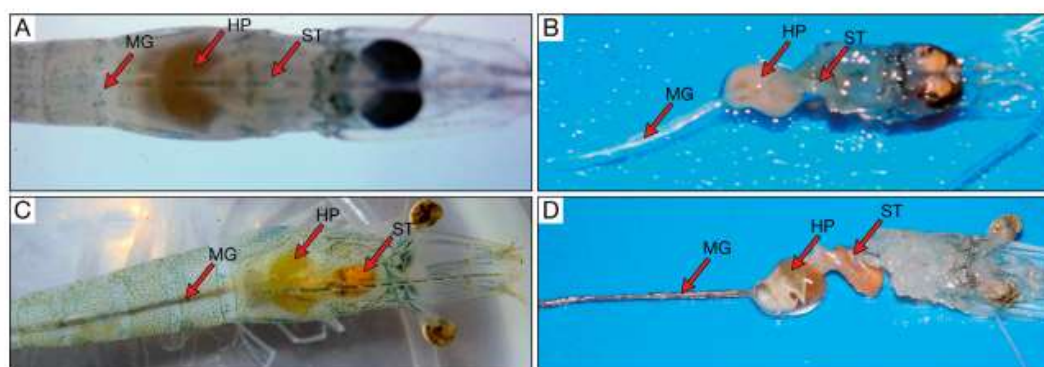


Figura 3. Disección de órganos internos de camarón *L. vannamei* sano (C y D) vs camarón con AHPND (A y B) durante la fase aguda de la enfermedad. Fuente: (Tran *et al.* 2013)

2.1.3.3. Estado actual de la enfermedad

Desde la aparición de la enfermedad a la fecha se han probado diferentes alternativas de tratamientos como probióticos (caseros y comerciales), antibióticos (enrofloxacina, oxitetraciclina y florfenicol) y otros (tecnologías de cultivo y líneas genéticas); sin embargo el problema sigue vigente, aunque la producción se ha “recuperado” estadísticamente la aparición de casos de AHPND en granjas es constante, en 2017 se reportaron sobrevivencias entre el 50-60(%) en casos positivos a AHPND, este efecto se debe a que los productores han aplicado estrategias en los sistemas de producción como uso de líneas genéticas resistentes, aumento de área de cultivo y densidades, para tratar de compensar las pérdidas ocasionadas y cumplir con la demanda de producción, sin llegar realmente a una solución al problema (Soto-Rodriguez 2019).

2.1.4. Tratamiento de enfermedades bacterianas en acuacultura

El tratamiento más utilizado en casos de enfermedades ocasionadas por bacterias es el empleo de antibióticos, por décadas el uso de estas sustancias ha ayudado a controlar el

crecimiento de bacterias patógenas en la acuicultura. Sin embargo, su empleo en los últimos años ha sido causa de mucha controversia en la industria debido a que su uso continuo con fines profilácticos o correctivos ha generado importantes cambios en el ecosistema acuático debido a su alta dispersión y persistencia en el medio ambiente durante mucho más tiempo del originalmente esperado (Kolpin, 2002), dentro de estos efectos se incluyen alteración de la estructura filogenética en las comunidades bacterianas nativas del ecosistema, aumento de su resistencia y alteración de su función ecológica en el micro ecosistema (Chan Ding, 2010).

Por otra parte, otro de los riesgos relacionado al uso constante de antibióticos en acuicultura es la bioacumulación en los tejidos comestibles de los animales, por consecuencia la presencia de estos residuos de antimicrobianos puede ocasionar riesgos a la salud de los consumidores tales como: alergias, cambios en el microbioma intestinal y la adquisición de resistencia a medicamentos. Debido a esto, el uso de antibióticos para controlar las cepas patógenas en la acuicultura de camarón en los últimos años se encuentra restringido en la mayoría de los países (Krishnamoorthy *et al.* 2014; OIE, 2014), por lo que la necesidad de desarrollar un productos alternativos para control de patógenos en la producción de camarón es un aliciente para la ciencia dentro de este sector económico.

2.1.5. Desarrollo de tratamientos alternativos en acuicultura

Dentro de este contrastante avance, los acuicultores han aumentado la búsqueda de productos naturales alternativos con propiedades antibacterianas y/o inmunoestimulantes que aumenten la sobrevivencia en los cultivos.

2.1.5.1. Probióticos

Hoy en día uno de los tratamientos más eficaces y con menos efectos secundarios en animales son los probióticos, estos organismos vivos con actividad inmunomoduladoras se utilizan con frecuencia en el cultivo de camarón y resultan ser prometedores. Aunque, su uso es todavía una cuestión de debate ya tiene algunos riesgos asociados en cuanto a la correcta la elección de los probióticos, lo cual resulta esencial para garantizar que el organismo sea inofensivo para el huésped, ya que existe la preocupación de que los organismos aparentemente inofensivos puedan recuperar la virulencia o ser patógenos para diferentes especies de los estudiados (Irianto and Austin 2002; Pérez-Sánchez *et al.* 2014).

2.1.5.2. Extractos fitoquímicos y compuestos aislados

Los extractos fitoquímicos de macroalgas o plantas de origen terrestre y/o sus compuestos aislados también son frecuentemente utilizados por sus propiedades antimicrobianas e inmunoestimulantes, sin embargo, una desventaja importante es la aplicabilidad de cualquiera de estos extractos o aislados a escala comercial ya que el principal problema es el costo de extracción y su aplicación en sistemas de cultivo intensivo (Vatsos and Rebours 2015).

2.1.5.3. Nanopartículas

La nanotecnología se ha convertido también en una de las soluciones propuestas a este problema, su desarrollo y aplicación ha aumentado considerablemente desde principios del siglo XXI. Los compuestos nanoestructurados se han convertido en parte de nuestra vida diaria principalmente en la industria farmacéutica, cosméticos y ambiental (Rai *et al.* 2009; Swain *et al.* 2014; Chinnappan *et al.* 2015; Sivaramasamy and Zhiwei 2016a). Las nanopartículas metálicas sintetizadas por metodologías “verdes” poseen ventajas sobre otros tratamientos alternativos debido a que su producción es amigable con el medio ambiente, de precio accesible, son fácilmente escalables, se administran en pequeñas cantidades y además debido a sus múltiples mecanismos de acción presentan capacidad para superar la resistencia bacteriana. Sin embargo, el uso de las nanopartículas en la acuicultura es poco usual debido a que su introducción es reciente y por ello existen algunas interrogantes sobre su aplicación, una de ellas es su toxicidad.

2.2. Actividad anti-*Vibrio in vitro* de nanopartículas

Se han reportado estudios demuestran la eficacia antibacteriana de AgNPs sintetizadas con diversos agentes reductores entre ellos extractos de plantas, bacterias, membranas poliméricas, además de plata coloidal contra cepas de *Vibrio* de importancia humana y acuícola, lo cual sugiere que el uso de AgNPs podría ser un tratamiento efectivo contra las enfermedades ocasionadas por estas cepas. Dentro de estos trabajos, se reporta un amplio rango de zonas de inhibición que va desde los 2.1 hasta a los 21.25 mm obtenidos con dosis de 8.5-10 µg por disco, entre las especies de *Vibrio* probadas se encuentran cepas, tales como: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* (ver referencias y datos en Tabla 3). Adicionalmente, se ha demostrado que las cepas de *Vibrio*

Tabla 3. Actividad anti-*Vibrio in vitro* de nanopartículas de plata

Agente reductor	Composición	Concentración	Cepas	mm de inhibición	Referencia
Bacterias					
<i>Brevibacterium frigiditolerans</i>	Plata	50 µL de 1 mM (8.5 µg por disco)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25+ 1.0 mm	(Singh <i>et al.</i> 2015)
<i>Bacillus subtilis</i>	Plata	50 µL de 1 mM (8.5 µg por disco)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21.25 ± 2.55 mm	(Sivaramasamy and Zhiwei 2016a)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Plata	-	<i>Vibrio harveyi</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19.27 ± 1.36 mm 20 mg ml ⁻¹ , 3 mm 30 mg ml ⁻¹ , 4 mm 50 mg ml ⁻¹ , 6 mm 100 mg ml ⁻¹ 8 mm	(Shanthi <i>et al.</i> 2016)
Plantas					
<i>Camellia Sinensis</i>	Plata	10 µg por disco	<i>Vibrio cholerae</i>	13-15 nm	(Geoprincy <i>et al.</i> 2011)
<i>Propolis chillensis</i>	Plata	50 µL de 1 mM (8.5 µg por disco)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio harveyi</i> <i>Vibrio cholerae</i>	19 ± 2.8 mm 16 ± 2.7 mm 22 ± 3.5 mm	(Kandasamy <i>et al.</i> 2012)
<i>Azadirachta indica</i>	Plata	10µl µg por disco	<i>Vibrio cholerae</i>	14 nm	(Renugadevi and Venus Aswini 2012)
Otros					
Membrana de carboxycelulosa	Plata	10 µg ml ⁻¹	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AHPND + <i>Vibrio harveyi</i> AHPND + <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AHPND +	11 + 2.1 mm 10 + 1.8 mm 3.0 mg ml ⁻¹ -12.0 4.5 mg ml ⁻¹ -13.8 6.0 mg ml ⁻¹ -16.8 8.0 mg ml ⁻¹ -18.8	(Sivaramasamy <i>et al.</i> 2017) (Morales-Covarrubias <i>et al.</i> 2016)

causantes de AHPND+ son susceptibles al tratamiento con AgNPs

2.3. Síntesis de nanopartículas de plata con extractos de macroalgas

Las algas marinas son consideradas una rica fuente de metabolitos biológicamente activos con propiedades antifúngicas, antibacteriales y antivirales; además entre sus aplicaciones sus extractos se han destacado como excelentes agentes reductores y formadores de nanopartículas altamente estables (Singaravelu *et al.* 2007; Ponnuchamy and Jacob 2016). Actualmente, se han reportado al menos 38 trabajos de investigación donde se reporta la síntesis verde de nanopartículas de oro o plata utilizando diferentes tipos de extractos acuosos, hidroetanólicos y de acetato de etilo, realizados a partir de algas verdes (24 %), rojas (21 %) y cafés (55 %), las nanopartículas sintetizadas se han reportado con rangos

de tamaño que van desde los 2 a los 96 nm. Como ventajas, estos autores resaltan su alta tasa de síntesis, además de una excelente estabilidad coloidal incluso mejor que las nanopartículas sintetizadas con otros compuestos reductores de origen fitoquímico; estos autores concluyen que el poder reductor para formar las nanopartículas metálicas es atribuido a los polisacáridos sulfatados, alcaloides, esteroides, fenoles, saponinas, flavonoides y grupos funcionales derivados de estos compuestos presentes en las algas (ver Tabla 4).

Tabla 4. Nanopartículas metálicas sintetizadas a partir de algas verdes, rojas y cafés

Alga	Tipo	Tamaño (nm)	Forma	Agente reductor	Aplicación	Referencia
Algas verdes (<i>Chlorophyta</i>)						
<i>Ulva lactuca</i>	Plata	48.59	Esférica	Compuestos fenólicos, aminos y anillos aromáticos	Degradación foto catalítica	(Kumar <i>et al.</i> 2013a)
<i>Ulva lactuca</i>	Plata	10 a 30	Esférica	Fitoquímicos	Actividad antibacteriana	(Raja <i>et al.</i> 2012)
<i>Ulva fasciata</i>	Plata	40.05	Esférica	Extracto crudo de acetato de etilo	Actividad antibacteriana	(Rajesh and Raja 2012)
<i>Urospora spp.</i>	Plata	20 a 30	Esférica	Fitoquímicos	Actividad antibacteriana	(Suriya <i>et al.</i> 2012)
<i>Codium capitatum</i>	Plata	3 a 44	Nano-clúster	Proteínas	-	(Kannan <i>et al.</i> 2013b)
<i>Enteromorpha flexuosa</i>	Plata	2 a 32	Circular	-	Actividad antibacteriana	(Yousefzadi <i>et al.</i> 2014)
<i>Caulerpa scalpeliformis</i>	Plata	-	Esférica y cubica	Aminoácidos y proteínas	Mosquicida	(Murugan <i>et al.</i> 2015a)
<i>Ulva lactuca</i>	Plata	-	Cubica	Polifenoles	Control de Malaria	(Murugan <i>et al.</i> 2015b)
<i>Ulva clathrata</i>	Plata y cloruro de plata	9.50	Esférica y polimórfica	Polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos	Actividad antibacteriana	Maldonado- Muñiz <i>et al</i> 2019
Algas rojas (<i>Rhodophyta</i>)						
<i>Acanthophora spicifera</i>	Plata	48	Esférica	Compuestos fenólicos	Actividad antibacteriana	(Kumar <i>et al.</i> 2012c)
<i>Gracillaria corticata</i>	Plata	18 a 46	Esférica	Polifenoles y taninos	Actividad antifúngica	(Kumar <i>et al.</i> 2013b)
<i>Gelidiella acerosa</i>	Plata	22	Esférica	Compuestos aromáticos alcanos y aminos	Actividad antifúngica	(Satish <i>et al.</i> 2017)
<i>Hypnea musciformis</i>	Plata	2 a 55.8	Cubica	Péptidos cíclicos	Degradación foto catalítica	(Ganapathy Selvam and Sivakumar 2015)
<i>Hypnea musciformis</i>	Plata	40 a 65	Esférica	Oxidación <i>In situ</i> de grupos hidroxilo	Actividad larvicide	(Roni <i>et al.</i> 2015)
<i>Galaxaura elongata</i>	Oro	3.8 a 77.1	Esférica	Residuos amino y péptidos de proteínas	Actividad antibacteriana	(Abdel-Raouf <i>et al.</i> 2013)
<i>Pterocladia capillacea</i>	Plata	11.4	Esférica	Proteínas	Actividad anticáncer	(El Kassas and Attia 2014)
<i>Corallina officinalis</i>	Oro	14.6	Esférica	Grupos funcionales hidroxilo- y amino	Actividad anticáncer	(El-Kassas and El-Sheekh 2014)
Algas cafés (<i>Phaeophyta</i>)						

<i>Sargassum wightii</i>	Oro	8 a 12	Esférica	-	-	(Singaravelu <i>et al.</i> 2007)
<i>Sargassum wightii</i>	Plata	8 a 27	Esférica	Grupos alcohólicos y ácidos carboxílicos	Actividad antibacteriana	(Govindaraju <i>et al.</i> 2009)
<i>Sargassum wightii</i>	Plata	15 a 20	Esférica	Polifenoles, proteínas/enzimas y/o polisacáridos	Actividad antibacteriana	(Shanmugam <i>et al.</i> 2014)
<i>Sargassum longifolium</i>	Plata	30	Cubica	Proteínas	Actividad anticáncer	(Saraniya Devi <i>et al.</i> 2013)
<i>Padina tetrastrum</i>	Plata	20	Esférica	Compuestos aromáticos, alcanos o amidas	-	(Jegadeeswaran <i>et al.</i> 2012)
<i>Sargassum ilicifolium</i>	Plata	33 a 44	Esférica	-	Actividad antibacteriana y citotóxica in vivo	(Kumar <i>et al.</i> 2012a)
<i>Sargassum tenerrimum</i>	Plata	20	Esférica	Grupos hidroxilo-, metoxi-, cetonas y polisacáridos	Actividad antibacteriana	(Kumar <i>et al.</i> 2012b)
<i>Sargassum myriocystum</i>	Plata	10 a 23	Esférica	Polisacáridos extracelulares	-	(Stalin Dhas <i>et al.</i> 2012)
<i>Sargassum polycystum</i>	Plata	50 a 100	Esférica	Grupos carboxílicos, amino, fosfato e hidroxilo	Actividad anticáncer	(Thangaraju <i>et al.</i> 2012)
<i>Turbinaria conoides</i>	Oro	96	Esférica	Polifenoles, polisacáridos y aminas primarias	Actividad antibacteriana	(Rajeshkumar <i>et al.</i> 2013)
<i>Stoemchospermum marginatum</i>	Oro	18.7 a 93.7	Esférica, triangular y hexagonal	Terpenoides, polifenoles y compuestos fenólicos	Actividad antibacteriana	(Arockiya Aarthi Rajathi <i>et al.</i> 2012)
<i>Cystophora moniliformis</i>	Plata	75	Esférica	-	-	(Prasad <i>et al.</i> 2013)
<i>Padina gymnospora</i>	Plata	20 a 40	Esférica	-	Actividad antibacteriana	(Singh <i>et al.</i> 2013)
<i>Sargassum cinereum</i>	Plata	45 a 75	-	-	Actividad antibacteriana	(Mohandass <i>et al.</i> 2013)

2.4. Uso de alimentos adicionados con nanopartículas para control de enfermedades

La nanotecnología cuenta con aplicaciones la industria de la acuicultura tales como: tratamiento de aguas, esterilización de estanques, y recientemente como aditivo en alimentos para el control de enfermedades (Vijayan *et al.* 2016; Meneses Márquez *et al.* 2018). En los países asiáticos (India y China) se ha aumentado el uso de nanopartículas en esta industria (FAO, 2010; Meneses Márquez *et al.* 2018) pero en México, los estudios realizados sobre este tema son incipientes. Los primeros estudios reportados del uso de AgNPs (sintetizadas a base de fitoextractos o bacterias) administradas vía dietaria en camarón se centraron en el aprovechamiento de su potencial antimicrobiano para el control de enfermedades ocasionadas por especies de *Vibrio* (Vaseeharan *et al.* 2010; Kandasamy *et al.* 2012; Morales-Covarrubias *et al.* 2016; Sivaramasamy and Zhiwei 2016; Alvarez-Cirerol *et al.* 2019). Las AgNPs se han evaluado en especies de importancia económica como: *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus indicus* y *Penaeus*

monodon desafiados con cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, *cholerae* o *harveyi* (Tabla 3). Existen hallazgos donde se concluye que la plata en forma coloidal también tiene un efecto protector contra *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+ en organismos *L. vannamei* previamente alimentados con dietas adicionadas plata coloidal comercial (Morales-Covarrubias *et al.* 2016).

Tabla 5. Evaluación de alimentos adicionados con nanopartículas para control de enfermedades

Tipo de nanopartículas	Especie	Dosis administrada en alimento	Infección	Sobrevivencia (%)	Referencia
AgNPs (extracto de <i>Propolis chilensis</i> L)	<i>P. monodon</i>	0.1 mg de AgNPs en 10 mg de alimento	<i>V. cholerae</i> , <i>V. harveyi</i> , y <i>V. parahaemolyticus</i>	60	(Kandasamy <i>et al.</i> 2012)
AgNPs (<i>Camellia sinensis</i>)	<i>F. indicus</i>	5 y 10 mg AgNPs (5 días)	<i>V. harveyi</i>	70	(Vaseeharan <i>et al.</i> 2010)
AgNPs (extracto de <i>Rumex dentatus</i>)	<i>L. vannamei</i>	<i>A. franciscana</i> como vector 50 µg/mL de AgNPs	<i>V. parahaemolyticus</i>	87.5	(Alvarez-Cirerol <i>et al.</i> 2019)
AgNPs <i>Bacillus subtilis</i>	<i>L. vannamei</i>	0.1 mg de AgNPs en 10 mg de alimento	<i>V. parahaemolyticus</i>	85.5	(Sivaramasamy and Zhiwei 2016a)
Plata coloidal	<i>L. vannamei</i>	0.5 ml g ⁻¹ de alimento	<i>Vp</i> AHPND+	90	(Morales-Covarrubias <i>et al.</i> 2016)

2.5. Distribución, bioacumulación y cinética de depuración de nanopartículas administradas vía dietaria

En este tema, algunos investigadores han estudiado la bioacumulación y transferencia de metales nobles y pesados, incluida la plata iónica, radiomarcada o compleja en zooplankton, peces y crustáceos con el propósito de establecer el estado actual de acumulación, distribución y migración dentro de la cadena trófica de metales producto de la contaminación en el ecosistema o por la migración ocasionada por el consumo de dietas contaminadas (Metian *et al.* 2010; Wang 2013; Lacave *et al.* 2017). Sin embargo, en camarón se carece de estudios enfocados a proporcionar información sobre la acumulación de los productos antibacterianos de nueva generación fabricados con nanotecnología para promover su uso a dosis apropiadas que tengan un impacto mínimo en los sistemas biológicos.

Se han documentado y adoptado diferentes directrices de ensayos para determinar experimentalmente la bioacumulación en peces e invertebrados. Las que se aplican con carácter más general son la Directriz 305 de la OECD (OECD, 2012) y la guía normalizada

ASTM (ASTM 2002), los principios de las ambas directrices son similares y describen un procedimiento normalizado para la evaluación del potencial de bioacumulación y bioconcentración de cualquier sustancia química en peces tras su exposición a través del agua o de la dieta, bajo condiciones definidas bajo un régimen de administración. Generalmente, se trata de un ensayo con peces que consta de dos fases: una de exposición a la sustancia de estudio (absorción) y otra de post-exposición (depuración). Durante la depuración, los peces se transfieren a un medio exento de la sustancia a prueba. La concentración de ésta en el pez deberá determinarse en distintos tiempos de muestreo durante cada una de las fases de ensayo, estos modelos podrían adaptarse y aplicarse a modelo camarón para definir tasas de distribución, bioacumulación y cinética de depuración

2.6. Efecto de nanopartículas sobre histología de camarón

Estudios realizados sobre el efecto histológico en camarón a la fecha no han sido reportados, pero sí para otros invertebrados (*Daphnia magna*) y en peces (*Danio rerio* y *Rainbow trout*) estos organismos han sido expuestos por vía acuosa en agua dulce en un amplio rango de dosis que van desde 5 ng hasta 100 mg ml⁻¹ estas dosis son definidas de acuerdo a la especie de prueba (Bianchini and Wood 2002; Bilberg *et al.* 2012; Monfared and Soltani 2013; Mackevica *et al.* 2015; Yazdanparast *et al.* 2016). Sin embargo, estos autores concuerdan que la diversidad en los resultados de toxicidad de AgNPs reportados organismos acuáticos está fuertemente ligados a diferentes factores ambientales (pH, salinidad), vía de exposición (agua, alimento), y características físicas que afectan su biodisponibilidad (liberación de iones, tamaño, forma, carga, recubrimiento de las NPs, solubilidad) (Scown *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012; Macken *et al.* 2012).

2.7. Influencia del consumo de dietas con AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas sobre la biodiversidad de la microbiota fecal de *L. vannamei*

La metagenómica ha surgido en la última década como una prometedora herramienta que provee información sobre la diversidad del microbioma para obtener una comprensión más profunda sobre roles bacterianos en la salud de los organismos (Martínez-Porchas and Vargas-Albores 2017). El microbioma intestinal desempeña un papel integral en la

salud del huésped al estimular el desarrollo del sistema inmune, ayudando en el aprovechamiento de nutrientes y superando a los patógenos oportunistas (Tarnecki *et al.* 2017). Actualmente, se han reportado estudios donde se confirma que la dieta tiene una influencia directa en la diversidad de la microbiota intestinal del huésped y por consecuencia en la del medio ambiente (Claesson *et al.* 2012; Cornejo-Granados *et al.* 2017; Tarnecki *et al.* 2017). Por otra parte, estudios confirman que el microbioma fecal es un reflejo directo del microbioma intestinal, resultando como una forma de análisis no invasiva para los organismos (Sugita *et al.* 1987; Oetama *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2017).

En el área de la acuicultura es una práctica común el uso de productos que ayuden a mejorar la resistencia contra enfermedades y que a su vez aumenten el rendimiento de producción; dentro de ellos destacan moléculas de origen natural o sintético con poder antimicrobiano y recientemente los probióticos y las partículas nanoestructuradas (Narrowe *et al.* 2015; Sivaramasamy and Zhiwei 2016; Sivaramasamy *et al.* 2017), estos productos son con frecuencia añadidos directamente en el agua o suministrados vía alimentaria (Merrifield *et al.* 2013; Martínez-Porchas and Vargas-Albores 2017; Vargas-Albores *et al.* 2017). Actualmente, existe información sobre la modificación y/o restauración en el microbioma intestinal una vez que moléculas con actividad antibacteriana (p ej. triclosán), nanopartículas y probióticos son administrados vía dietaria en peces (Narrowe *et al.* 2015; Vargas-Albores *et al.* 2017; Adamovsky *et al.* 2018). Sin embargo, la modificación de la microbiota intestinal en camarón debido al consumo nanopartículas no ha sido reportado previamente.

3. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de AHPND en cultivos de camarón en México y a nivel mundial sigue vigente, y a la fecha no se ha encontrado una solución eficaz para el tratamiento de dicha enfermedad. La nanotecnología puede ofrecer una solución alternativa en acuicultura para el tratamiento de enfermedades bacterianas emergentes y minimizar los daños ocasionados por el uso de antibióticos y por consiguiente mejorar la producción de camarón.

La aplicación de las nanopartículas en acuicultura es reciente y por ello existen múltiples interrogantes sobre su utilización. Actualmente, existen estudios que corroboran que las AgNPs pueden ser producidas por extractos de macroalgas y que estas tienen actividad antivibrio; sin embargo, no existen estudios que determinen dosis efectivas para su uso ni en los cuales se defina la mejor forma de administración, así como su tasa de acumulación y depuración, ni su impacto sobre los consorcios bacterianos dentro del tracto gastrointestinal en camarón.

Es por esto, que se pretende aportar información pertinente que sirva como base para la administración segura de AgNPs en sistemas de cultivo para camarón y ofrecer un producto eficaz que cumpla con los requisitos que hoy en día son necesarios: amigable con el medio ambiente, de fácil producción y de baja o nula toxicidad.

4. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de macroalgas poseen actividad antimicrobiana contra *Vp* AHPND+ y su inclusión en dietas peletizadas puede ser una forma de tratamiento alternativa contra AHPND.

5. OBJETIVO GENERAL

Producir eficientemente nanopartículas de plata a base de extractos de algas y evaluarlas como aditivo dietario, para ser utilizadas como una alternativa en el manejo de AHPND en camarón.

5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) con extractos acuosos e hidroetanólicos de 7 macroalgas mexicanas; seleccionar mejores AgNPs en base a mejor estabilidad y actividad antibacteriana para su posterior caracterización y evaluación *in vivo*.
- Estandarizar la forma de inclusión de las AgNPs en las dietas para camarón y evaluar su estabilidad
- Evaluar el efecto sobre parámetros zootécnicos debido al consumo dietas adicionadas con AgNPs.
- Evaluar la acumulación y depuración de Ag en tejidos de camarón alimentados con dietas adicionadas con AgNPs
- Evaluar la toxicidad de alimentos adicionados con AgNPs en camarón en términos de histología
- Evaluar el efecto protector de un alimentos adicionados con 10 y 100 ppm de AgNPs contra Vp AHPND⁺ *in vivo*
- Evaluar la influencia del consumo de dietas con AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas sobre la biodiversidad de la microbiota fecal de *L. vannamei*

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Reactivos

Agua ultra pura estéril (W3500), nitrato de plata (209139), sal de resazurina de sodio (R7017), antrona (319899), Folin-ciocalteu (F-9252), carbonato de sodio (S-2127) y cloruro de sodio (V000106) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (USA). Los medios bacteriológicos agar soya tripticaseína (TSA), caldo soya tripticaseína (TSB), agar Mueller Hinton (MHA), caldo Mueller Hinton (MHB) y agar agar (AA) fueron obtenidos de Difco (USA), etanol absoluto fue adquirido en Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ, Monterrey, N.L., México)

6.2. Origen de cepas

Las cepas de *Vibrio* evaluadas durante este proyecto de investigación fueron obtenidas de la Collection of Aquacultural Important Microorganisms (CAIM) a cargo del Dr. Bruno Gómez-Gil del CIAD unidad Mazatlán, Sinaloa (<https://www.ciad.mx/caim/CAIM>). Se evaluaron un total de siete cepas de *Vibrio*, tres de ellas *V. parahaemolyticus* AHPND+ (M9-04, M6-05, M5-28) las cuales fueron previamente aisladas de estómago y hepatopáncreas de camarones de granjas afectadas con AHPND en el noroeste de México, el procedimiento de aislamiento, identificación molecular y nivel de patogenicidad fueron reportados previamente por Soto-Rodriguez *et al.* 2015. Las otras cuatro fueron *V. harveyi* CAIM 1792, *V. campbellii* CAIM 333, *V. vulnificus* CAIM 611y *V. parahaemolyticus* CAIM 170 (ver Tabla 6). Las cepas fueron mantenidas en criopreservación (-80 °C) hasta su utilización, su activación fue llevada a cabo en medio TSB +NaCl 2(%).

Tabla 6. Cepas de *Vibrio* evaluadas

Cepa	Serotipo	AHPND	Patogenicidad
<i>V. parahaemolyticus</i> *	M9-04	+	Alta
<i>V. parahaemolyticus</i> *	M6-05	+	Media
<i>V. parahaemolyticus</i> *	M5-28	+	Nula
<i>V. parahaemolyticus</i>	CAIM 170	-	-
<i>V. harveyi</i>	CAIM 1792	-	-
<i>V. campbellii</i>	CAIM 333	-	-
<i>V. vulnificus</i>	CAIM 611	-	-

6.3. Algas marinas

Se utilizaron 7 macroalgas mexicanas (1 verde y 6 pardas) *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh fue obtenida a partir de un sistema de cultivo a gran escala ubicado en Sinaloa, México. Los detalles en las condiciones de producción y procesamiento son reportados previamente por Peña-Rodríguez *et al.* 2011. Las algas pardas *Silvetia compressa* (J. Agardh) (De Toni 1985), *Cystoseira osmundacea* (Turner) (C. Agardh 1820), *Ecklonia arborea* (Areschoug 1876), *Pterygophora californica* (Ruprecht, 1852), *Egregia menziesii* (Turner) (Areschoug 1876) y *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) (C. Agardh 1820), fueron obtenidas de la empresa BajaKelp (<https://www.bajakelp.net>) ubicada en Ensenada, Baja California, México. El personal de buceo de la empresa realizó la colecta de podas selectivas en el periodo de diciembre de 2014 a enero de 2015 en zona de La Escalera, Península de Baja California, México (31° 30' 59.1" N -116° 38' 51.1" W) (ver Figura 4). Las frondas se lavaron con agua de mar para eliminar arena, conchas y las epifitas, posteriormente, fueron colocadas a temperatura ambiente sobre tendedores de red, y se trasladaron a un invernadero donde se continuó con el proceso de secado a temperatura ambiente, las especies fueron protegidas de la luz UV con malla-sombra durante 1 semana. Las muestras ya secas fueron enviadas a Monterrey, Nuevo León a través de paquetería terrestre envueltas en sacos de polipropileno.

6.3.1 Molienda

Posteriormente las algas fueron molidas en un turbo molino (Pulvex 200, CDMX, MEX) con un tamiz de tamaño de partícula de 500 µm, una vez molidas las muestras fueron almacenadas al vacío en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

31°30'59.1"N 116°38'51.1"W

Area de colecta

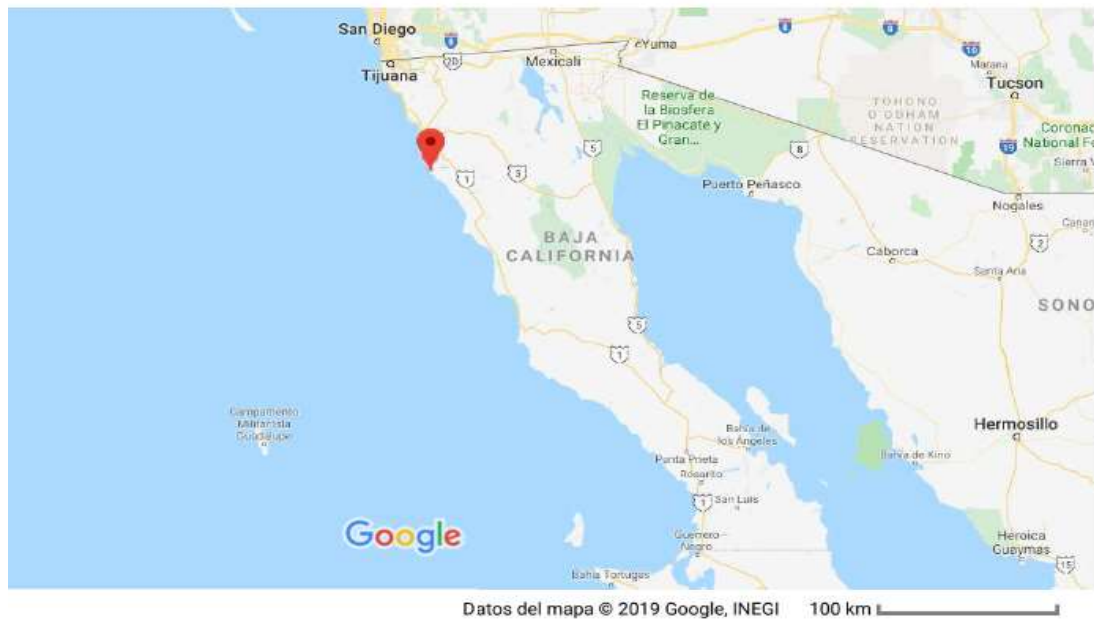


Figura 4. Área de colecta de macroalgas pardas en La Escalera, Península de Baja California, México

6.3.2 Identificación taxonómica de macroalgas

Antes de la molienda se tomó una muestra representativa de las algas, para realizar su identificación taxonómica. La identidad de las seis especies de algas pardas se confirmó con la ayuda del Dr. Sergio M. Salcedo del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL, la cual fue basada en la comparación de la forma tamaño y características de estructuras vegetales con claves taxonómicas de acuerdo con Sears 2002.

6.3.3 Análisis proximal

La composición proximal en las harinas de alga fue determinada utilizando las siguientes metodologías: Humedad (AOAC, 1997, método 930.15), proteína cruda (método de combustión y utilizando el equipo LECO, AOAC 1997, método 990.03), lípidos (método Soxhlet, Tecator, 1983), ceniza (AOAC, 1997, método 942.05) y el extracto libre de nitrógeno (ELN) fue obtenido por diferencia. Todos los análisis fueron realizados por triplicado, para el análisis estadístico de los datos se realizó un ANOVA de una vía,

seguido de Tukey post hoc ($p < 0.05$). Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete Statistica 8.0 (software TIBCO, Palo Alto, CA, EE. UU.).

6.4. Obtención y caracterización de extractos

6.4.1. Extractos acuosos

Se agregaron 10 g de cada una de las especies de alga previamente molida en matraces Erlen Meyer conteniendo 200 ml de agua destilada caliente (90°C) con agitación constante durante 15 minutos, posteriormente se mantuvieron en reposo en total oscuridad durante 12 h, los extractos fueron centrifugados (IEC CentraMP4R, International equipment company, USA) a 2 500 rpm durante 15 minutos, los precipitados fueron lavados dos veces con 100 ml de agua caliente a 90°C. Finalmente, el extracto fue ultracongelado (ULT 1386-3-A14, Revco Scientific Inc., USA) a -80°C para su posterior secado por liofilización (Freezone Benchtop 6L, Labconco, USA).

6.4.2. Extractos hidroetanólicos

Para la elaboración de los extractos hidroetanólicos se utilizó la metodología descrita por Múzquiz *et al.* 2019. Para esto, se mezclaron 10 g de polvo de cada una de las especies de algas y 200 ml de etanol/agua al 50(%) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se sonicaron (Ultrasonic cleaner 50HT, VWR International, West Chester, PA, USA) durante 30 minutos; las muestras se incubaron con agitación constante a 100 rpm (Shak-R Bath, Lab line, Melrose Park, IL, EE. UU.) Durante 2 h a 70 ° C. Posteriormente, las muestras se atemperaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos, finalmente el sobrenadante fue almacenado a -80 ° C hasta su uso.

6.4.3. Cálculo de rendimiento de extractos

Para obtener el rendimiento de ambos extractos se colocó por triplicado una muestra de 1 ml del extracto en tubos de ensaye previamente pesados, se pesó, se evaporó en una estufa de aireación (Shel Lab 1330 FX, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, EE. UU.) a 130 °C durante 60 minutos (g de sólidos totales), se atempero en un desecador durante 30 minutos y se pesó nuevamente. El rendimiento de extracción sólida se calculó con la formula (1):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{(\text{g de solidos totales}) * (\text{ml de extracto total})}{(\text{g de alga seca})} \times 100 \quad (1)$$

6.4.4. Cuantificación de compuestos fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos (CFT) se determinó utilizando el método Folin-Ciocalteu (Cabello-Pasini *et al.* 2011) donde 200 µL de cada extracto líquido se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se mezclaron con 50 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (2 M) y 750 µL de carbonato de sodio (7.5% p/v), la mezcla se homogeneizó durante 15 s en un vortex (Vortex mixer VWR, Radnor, PA, EE. UU.) y se dejó reposar en completa oscuridad durante 2 h y se centrifugó (2500 rpm, 15 min). Se transfirieron 200 µL de cada reacción de muestra a una microplaca de 96 pocillos, y se registró la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas (Epoch 2, BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, EE. UU.). El CFT se determinó mediante la comparación de los valores obtenidos con la curva de calibración de floroglucinol usando una curva de calibración de siete puntos (0 a 1.25 mg mL⁻¹) con la formula $y=1.0101x+0.0468$, $R^2=0.998$ (2). Los resultados se expresaron como g de equivalentes de floroglucinol (PGE) por cada 100 g de extracto seco (%).

6.4.5. Cuantificación de azúcares totales

La cuantificación de azúcares totales en los extractos fue realizada de acuerdo al método de Antrona (Yemm and Willis 1954), 50 mg de cada uno de los extractos fueron colocados en 100 ml de H₂SO₄ 1 M y fueron mantenidos en ebullición durante 3 horas; posteriormente, 1 ml de extracto fue colocado en tubos de ensaye, se adicionaron 5 ml del reactivo de antrona (100 mg en 100 ml de H₂SO₄ concentrado), los tubos fueron mantenidos a baño María por 12 minutos a 70 °C, finalmente los tubos fueron atemperados y se leyó la absorbancia a 630 nm. Se preparo una curva de calibración de fucosa (0.05 a 0.40 mg mL⁻¹) para cuantificar el contenido de azúcares totales por regresión linear con la formula $y=2.12x+0.135$, $R^2= 0.989$ (3) y fue expresado g equivalentes de fucosa por cada 100 g de extracto seco (%).

6.4.6. Análisis estadístico

Las determinaciones de rendimiento, polisacáridos y CFT fueron realizados por triplicado, para el análisis estadístico de los datos se realizó un ANOVA de una vía, seguido de Tukey

post hoc ($p < 0.05$). Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete Statistica 8.0 (software TIBCO, Palo Alto, CA, EE. UU.).

6.5. Síntesis de nanopartículas

Las AgNPs elaboradas a partir de extractos acuosos fueron producidas por síntesis verde de acuerdo con la metodología descrita en la solicitud de patente MX/002621/IMPI (Luna *et al.* 2015) mediante la adición de 100 ml de una solución acuosa de AgNO_3 (1×10^{-3} M) a un matraz con 170 mg de extracto acuoso previamente disuelto en 100 ml de agua ultra pura Sigma. Mientras que la síntesis de las AgNPs con extractos hidroetanólicos se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Abdel-Raouf *et al.* 2013, se colocó 1 ml de extracto hidroetanólico en 100 ml de una solución acuosa AgNO_3 (1×10^{-3} M), en ambas síntesis la mezcla fue mantenida en agitación constante durante 48 horas a temperatura ambiente. La formación de AgNPs se confirmó por cambio de color de la solución a café rojizo.

6.5.1. Selección de nanopartículas

Las AgNPs con mejores características visuales de estabilidad efecto reductor basado en presencia de color café-rojizo, sin turbidez y sin precipitación después de 48 h posteriores a su síntesis fueron seleccionadas para su posterior purificación y evaluación antibacteriana *in vitro*, posteriormente las AgNPs con mejor actividad antibacteriana *in vitro* fueron nuevamente seleccionadas para su caracterización a detalle y su evaluación *in vivo*.

6.5.2. Purificación y cuantificación de Ag en nanopartículas

Las AgNPs seleccionadas se lavaron tres veces con etanol absoluto (relación 1:3) como anti disolvente para ayudar a la precipitación de las partículas, y fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 30 minutos. Finalmente, el precipitado purificado se volvió a dispersar con ultrasonido en agua ultra pura Sigma para estudios de caracterización adicionales. La concentración de Ag se midió por espectroscopía de absorción atómica (AAS) (ICE AAS 3500, ThermoScientific, Reino Unido) de acuerdo con el método AOAC 990.08 (AOAC 1997) y fue expresado en $\mu\text{g de Ag}^+ \text{mL}^{-1}$.

6.6. Caracterización de AgNPs

6.6.1. Barrido por espectroscopía UV-Visible

La presencia de AgNPs en las muestras coloidales purificadas por centrifugación fue confirmada con la medición del plasmón superficial de resonancia (SPR) mediante un barrido por espectroscopía UV-Vis (Epoch 2, BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, EE. UU) en el rango de longitud de onda de 300 a 800 nm. Las AgNPs que obtuvieron mejores resultados durante la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* fueron seleccionadas para una caracterización más detallada sobre su composición.

6.6.2. Composición estructural y morfología de partículas

Las fases cristalinas presentes en la muestra fueron identificadas mediante estudios de difracción de rayos X (XRD) (X'Pert PRO diffractometer, Panalytical, USA) con radiación de Cu K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). En este estudio, las muestras coloidales purificadas se secaron a 50 ° C durante la noche, obteniendo muestras secas en forma de polvo. Los valores de la longitud de coherencia media perpendicular a los planos cristalográficos (200) de AgCl y (111) de Ag metálica, L200, AgCl y L111, Ag, se estimaron utilizando la ecuación de Scherrer (4) (Luna *et al.* 2015b).

$$L_{hkl} = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (4)$$

Donde λ es la longitud de onda de rayos X, β es la ampliación del pico de difracción (después de restar la ampliación instrumental) y θ es el ángulo de Bragg.

La morfología de las partículas y las distribuciones de tamaño de las muestras sintetizadas fueron examinadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (TITAN 80-300 kV, FEI, OR, USA). Para obtener información más detallada sobre las propiedades microestructurales de las muestras, también se realizaron análisis de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y de difracción electrónica de área seleccionada (SAED). Para estos estudios, la muestra coloidal se diluyó adecuadamente con agua y se depositó una gota sobre una rejilla de cobre y se dejó secar en condiciones ambientales en un área de polvo libre. No hubo evidencia de transformaciones estructurales o químicas de las muestras durante el examen TEM. El procesamiento de las

micrografías TEM y el análisis de las imágenes HRTEM mediante transformadas rápidas de Fourier (FFT) fueron llevados a cabo utilizando el software Digital Micrograph 3.7.0 (Gatan Inc., Pleasanton CA, EE. UU.).

6.6.3. Composición superficial

Para identificar los grupos funcionales del extracto acuoso responsables de la reducción de iones Ag^+ a Ag^0 , y la acción estabilizadora de las nanopartículas basadas en Ag, se realizaron estudios de FTIR y Raman. Los espectros FTIR (Nicolet 510, ThermoFisher Scientific, MA, EE. UU.) se recogieron después de diluir la muestra en gránulos KBr en el rango de número de onda de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Los espectros Raman (HR800 UV Confocal Raman Microscope, Horiba Scientific, Edison, NJ, EE. UU.) se registraron en el rango de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ utilizando un láser verde (532.14 nm), trabajando a 600 líneas/mm , $100\times$ objetivo, 20 mW y orificio de 0.1 mm .

6.7. Actividad antibacteriana *in vitro*

6.7.1. Método de difusión en disco

Los ensayos de difusión en disco (antibiograma) fueron realizados en placas de agar Mueller Hinton (MHA) + 2(%) de NaCl inoculadas con $100\text{ }\mu\text{l}$ de cada suspensión bacteriana de V_p ($1\times 10^6\text{ UFC mL}^{-1}$). En condiciones asépticas, discos de papel de filtro (6 mm) fueron impregnados con $20\text{ }\mu\text{L}$ de cada solución de prueba extracto acuoso o hidroetanólico ($50\text{ }\mu\text{g}$ de extracto seco mL^{-1}), AgNPs, solución de AgNO_3 ($50\text{ }\mu\text{g}$ de Ag + mL^{-1}) o agua destilada (control negativo) y fueron colocados en las placas de MHA y después de 24 h de incubación a $29\text{ }^\circ\text{C}$, la zona de inhibición (ZI) se midió con un vernier digital (CD-6 "CS, Mitotuyo Corp., JPN); los valores ZI se registraron como el promedio (mm) de dos mediciones de diámetro por disco tomadas en direcciones perpendiculares (ver Figura 5). El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa y se realizó un ANOVA seguido de un a comparación de medias múltiple de Tukey para las diferentes cepas y tratamientos. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete Statistica 8.0 (software TIBCO, Palo Alto, CA, EE. UU.).

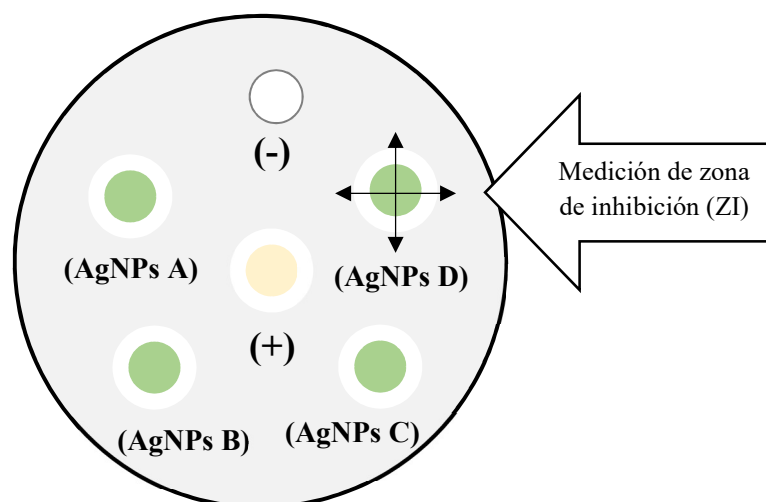


Figura 5. Lay-out de llenado de caja Petri durante ensayos de antibiograma; (-) control negativo agua destilada, (+) control positivo AgNO_3 , AgNPs (A, B o C) soluciones de nanopartículas

6.7.2. Ensayo de microdilución en placa

El ensayo de microdilución fue realizado de acuerdo con la metodología reportada por Sarker *et al.* 2007 con modificaciones. Se prepararon diluciones seriadas 1:1 a partir de una solución stock de 100 μg de Ag mL^{-1} de AgNPs y de AgNO_3 y cada una se añadió en cuatro pocillos de microplacas de 96 pocillos de poliestireno estéril (3370 Costar®, Kennebunk ME, EE. UU.), Se agregaron adicionalmente 100 μl de caldo Mueller Hinton (MHB) con NaCl al 2(%) y 50 μl de cada suspensión de cepa bacteriana (1×10^6 UFC mL^{-1}). Se utilizaron MHB puros con NaCl al 2(%), agua estéril y suspensión bacteriana como control negativo, mientras que los blancos evaluados fueron los tratamientos evaluados y los medios sin bacterias. Después de la incubación a 29 ° C durante 20 h, se añadieron 10 μl de solución de sal de resazurina de sodio al 0,1(%) y se incubaron durante 4 h más a la misma temperatura. El cambio de color se evaluó visualmente. Cualquier cambio de color de púrpura a rosa o incoloro se registró como crecimiento bacteriano positivo. La concentración más baja que produce un cambio de color se tomó como el valor MIC (Zhao and Stevens, 1998). La concentración más baja a la que no se produjo ningún cambio de color se registró en el MBC. El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa y se realizó un ANOVA seguido de un a comparación de medias múltiple de Tukey para las diferentes

cepas y tratamientos. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete Statistica 8.0 (software TIBCO, Palo Alto, CA, EE. UU.).

6.8. Preparación de alimento suplementado

Una dieta comercial con 44(%) de proteína y 8(%) de contenido de lípidos (742 UANL, Nutrimar, Sinaloa, México) fue suplementada por aspersión con diferentes concentraciones de Ag (0, 10, 100, 1 000 y 10 000 mg de Ag kg⁻¹), para esto soluciones estándar fueron preparadas a partir de una solución stock de AgNPs en el mismo volumen final de agua destilada (40 ml) y se rociaron sobre 100 gr de alimento previamente pesado y colocado en bandejas de aluminio. Las dietas se mezclaron durante cinco minutos para asegurar una homogeneización completa. Finalmente, la alimentación se secó en horno a 50 °C durante 1 h. La concentración final de Ag en los alimentos suplementados con AgNPs se cuantificó por AAS de acuerdo con el método AOAC 990.08 (AOAC 1997) y fue expresado en µg de Ag⁺ kg⁻¹.

6.8.1 Estimación de las pérdidas de AgNPs en dietas peletizadas (estabilidad en agua)

El porcentaje de pérdida de AgNPs en las dietas por lixiviación en agua de mar se calculó de acuerdo con lo descrito por Nieto-López *et al.* (2011) con modificaciones, incluyendo la corrección en el (%) de pérdida de materia seca (% PMS) en medio marino debido a la sal absorbida por las dietas sumergidas durante 1 h en agua de mar (35 g / L, 28 ° C). El contenido de Ag en las dietas después de lixiviar y en el agua de cada muestra se determinó por AAS y se expresó como mg Ag kg⁻¹ de materia seca o mg Ag L⁻¹ de agua.

6.9. Experimentos *in vivo*

Los experimentos *in vivo* fueron diseñados de acuerdo con las recomendaciones de la OCDE para la toxicidad aguda en artrópodos acuáticos (OECD, 2005) y la distribución de bioacumulación de la exposición alimentaria en peces (OECD, 2012), con la finalidad de evaluar efectos del consumo alimentos adicionados con AgNPs en: sobrevivencia de camarones desafiados, microbioma fecal, histología, toxicidad, bioacumulación y

depuración en diferentes tejidos.

6.9.1. Toxicidad aguda (7 días) y crónica (20 días)

En el ensayo de toxicidad aguda 150 camarones juveniles (0.400 ± 0.02 g peso promedio inicial) *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) fueron distribuidos aleatoriamente en 15 tanques de fibra de vidrio de 10 L (10 organismos por tanque, 3 replicados por tratamiento); mientras que en el ensayo de toxicidad crónica fue realizado con 144 organismos (0.87 ± 0.08 gr peso promedio) distribuidos en 12 tanques de fibra de vidrio de 10 L (12 organismos, 3 replicados). En ambos experimentos los organismos fueron alimentados con una ración equivalente al 5(%) de la biomasa durante 7 y 20 días respectivamente con dietas adicionadas con dosis nominales 0, 10, 100, 1 000, 10 000 mg de AgNPs kg^{-1} de alimento (la dieta de 10 000 mg de AgNPs kg^{-1} no fue incluida en el experimento de toxicidad crónica). En ambos experimentos las unidades experimentales fueron mantenidas con aeración individual y recambio manual diario del 100 (%) de agua marina sintética 35 ppm (Pro Aquatics, Fritz Industrial Inc., Mesquite TX, USA) y condiciones naturales de fotoperiodo. Los parámetros de calidad del agua (pH, salinidad, temperatura, amonio, nitritos, nitratos y oxígeno disuelto) fueron monitoreados diariamente. Se registró el efecto en el comportamiento además de parámetros zootécnicos tales como: sobrevivencia (%SA), ganancia de peso (% W), tasa de crecimiento (% TC), peso corporal promedio (g) expresado como peso final, y tasa de conversión alimenticia (TCA), los cuales fueron calculados de acuerdo con Cruz-Suarez *et al.* 2009.

6.9.2. Distribución en tejido

Para conocer la distribución de la AgNPs en los tejidos de camarón se utilizaron los organismos del experimento toxicidad aguda (ver punto 6.9.1.) se realizó una disección de hepatopáncreas, cutícula del cefalotórax y músculo de los camarones justo antes del comienzo (control) y al final de la exposición dietaria. El hepatopáncreas fue pesado individualmente y se determinó el índice hepatosomático (IPH) utilizando la formula (5). Finalmente, las muestras de órganos fueron secadas en el horno a 60°C durante 24 h y se almacenadas en un congelador a -20°C hasta su análisis de contenido de Ag° por absorción atómica (AA). Los resultados obtenidos fueron expresados en mg de Ag° kg^{-1} de peso seco.

$$IPH = \frac{\text{Peso del hepatopancr}}{\text{Peso final}} \cdot 100 \quad (5)$$

6.9.3. Cinética de depuración *in vivo*

Durante esta prueba *in vivo* se estableció una fase de exposición de 7 días y una de depuración de 14 días (OECD, 2012; Connolly *et al.* 2016). Durante la fase de exposición juveniles *L. vannamei* (1.9 ± 0.20 g peso promedio) fueron distribuidos aleatoriamente en 6 tanques rectangulares de fibra de vidrio de 10 L (19 organismos por tanque, 2 tratamientos y 3 replicados), los organismos alimentados durante la fase de exposición con 0 (control) y 100 mg de AgNPs kg^{-1} , mientras que la fase de depuración los dos grupos se alimentaron solo con dieta control. La duración total del experimento fue de 21 días. A los 0, 7, 16 y 21 días del ensayo, 3 camarones por tanque fueron seleccionados al azar para disectar grupalmente el hepatopáncreas, las branquias y el musculo. Finalmente, todas las muestras fueron secadas en estufa a 60°C durante 24 h y se almacenaron en un congelador a -20°C hasta su análisis de contenido de Ag° por absorción atómica AA. Los resultados obtenidos fueron expresados en mg de Ag kg^{-1} de peso seco. La tasa de depuración (k_2) y la eficiencia de la asimilación (α) fueron determinadas basándose en un modelo simple de dos compartimentos (OECD, 2012). La pendiente de la línea de regresión es un estimado de k_2 , mientras que α fue calculado con la formula (6):

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I_g \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad (6)$$

Donde: $C_{0,d}$ es la concentración en el organismo al tiempo 0 de la fase de depuración (mg Ag kg^{-1} de camarón); k_2 es la tasa de depuración (día^{-1}); C_{food} es la concentración real de AgNPs en el alimento (mg Ag kg^{-1} ; t es la duración del periodo de alimentación (día); I_g es la constante ingestión de alimento ajustada por crecimiento (g de alimento por g de camaron $^{-1}$ por día $^{-1}$) y es calculada durante la fase de exposición con la formula (7):

$$I_g = \frac{I \cdot W_0}{W_f} \quad (7)$$

Donde: I son los g de alimento por g de camarón⁻¹ por día⁻¹; W_0 es el peso promedio de los organismos al inicio del experimento y W_f es el peso de los organismos al final de la fase de exposición.

Una vez obtenida α , se calculó el factor de acumulación del alimento (FMF) multiplicando α por la constante de ingesta de alimento (I_g) dividida entre k_2 . Finalmente, la estimación del tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue estimado con la formula (8):

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_2} \quad (8)$$

6.9.4. Efectos en histología

En este experimento 264 organismos *L. vannamei* (1.2 ± 0.14 gr peso promedio) fueron distribuidos en 12 tanques rectangulares de 10 L (22 organismos por tanque, 3 replicados), los organismos fueron alimentados con el 5(%) de la biomasa durante 20 días con las dosis de 0, 10, 100 y 1 000 mg de AgNPs kg⁻¹ de alimento, durante este experimento las unidades experimentales fueron mantenidas bajo las mismas condiciones que el experimento de toxicidad aguda y crónica en cuanto condiciones de recambio, aireación y mantenimiento (ver punto 6.9.1.). Para la obtención de muestras histológicas, se colectaron 3 organismos de cada réplica a los 0, 5, 10 y 20 días de alimentación, se disectó el hepatopáncreas (HP), se pesó para evaluar índice hepatosomático y se fijó para histología en solución Davidson. Las muestras generadas para el análisis histológico fueron procesadas por la Dra. Sonia Soto Rodríguez y el MVZ. Rodolfo Lozano Olvera del CIAD unidad Mazatlán.

Todas las secciones de HP destinadas para histopatología se inyectaron y se mantuvieron en solución Davidson durante 4 días posterior a este tiempo se sustituyó el fijador por alcohol al 70 (%). Cada HP se cortó longitudinalmente por la línea media para su deshidratación e inclusión en parafina siguiendo lo recomendado por Bell y Lightner (1988). De cada muestra se obtuvieron cortes de 5 µm, los cuales fueron teñidos con la tinción de hematoxilina-eosina-floxina (H&E) según lo recomendado por Luna (1968). Los cortes histológicos de cada organismo se observaron en un microscopio compuesto Olympus CX31 (Olympus, Tokio, Japón) para identificar y describir los daños patológicos presentes en los tejidos. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de riesgo relativo

(RR) convirtiendo la prevalencia de las observaciones en datos dicotómicos ($p \leq 0.05$). Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el software Statistica 8.0

6.9.5. Desafío bacteriano

El desafío infeccioso fue llevado a cabo de acuerdo a la metodología de Soto-Rodriguez *et al.* 2015, durante la *etapa de alimentación* organismos de 0.422 ± 0.22 gr de peso promedio fueron distribuidos en 4 tanques de 120 L de agua marina sintética (35 ppm) con 150 organismos cada uno; el flujo de los tanques fue cerrado, aireación individual y recambio manual diario del 100(%). Los organismos se alimentaron con el 5(%) de la biomasa durante 7 días con los tratamientos adicionados con 0 (T1), 10 (T2) y 100 (T3) mg de AgNPs kg^{-1} (ppm) y una dieta comercial sin aditivos (SureStar-INVE) denominada como testigo (TEST) como control de calidad del desarrollo del desafío. Al sexto día de alimentación los organismos fueron redistribuidos al azar en las unidades experimentales (UE) de 10 L (ver Tabla 7.), 6 réplicas con 15 organismos para cada tratamiento (4 positivos infectados y 2 no infectados); los organismos continuaron con su alimentación hasta el día 7 en las UE con flujo cerrado, aireación individual, recambio diario de 50(%)

Tabla 7. Tratamientos evaluados durante ensayo infeccioso

Tratamiento	Replicas	Infección
T1 Control (0 ppm)	4	+
T2(10 ppm)	4	+
T3 (100 ppm)	4	+
TEST (SureStar-INVE)	4	+
T1 Control (0 ppm)	2	-
T2(10 ppm)	2	-
T3 (100 ppm)	2	-
TEST (SureStar-INVE)	2	-

En la *etapa de infección* (día 8), los organismos de los tratamientos positivos (T1+, T2+, T3+ y TEST+) fueron infectados con 15 mL de un inóculo de 2.5×10^9 UFC de Vp M9-04 AHPND⁺ y los tratamientos negativos (T1-, T2-, T3- y TEST-) con 15 mL de caldo TSB sin bacteria. Durante las horas post-infección (hpi) se registró tiempo y número de organismos muertos o moribundos, desarrollo de signos clínicos de la enfermedad, consumo de alimento, mudas, heces y parámetros de calidad de agua (NH_3 , NO_2 , y NO_3 , pH y temperatura). La mortalidad por AHPND en los organismos fue confirmada

mediante siembra de homogenizados de hepatopáncreas disectados de organismos moribundos y de agua de los acuarios horas después de la inoculación en medio TCBS, de las colonias verdes obtenidas en el medio TCBS se resembró una colonia aislada por muestra en tubos con TSB al 2(%) de NaCl incubadas por 24 h $30 \pm 1^\circ\text{C}$; la purificación de las cepas de los inóculos y de las colonias aisladas se realizó tomando una muestra del caldo de cultivo TSB en ChromAgar Vibrio, posteriormente se incubaron durante 24-48 h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y se confirmó la presencia de colonias malvas. Finalmente, se realizó detección por PCR de marcadores moleculares de acuerdo con la metodología descrita en el Anexo 1.

Durante el análisis estadístico se realizó un Anova de una vía seguido de un Tukey post hoc para los datos de distribución en las UE. La sobrevivencia (% S) fue analizada por Kaplan-Meier (Log), comparación de medias entre tratamientos por Holm-Sidak y Kruskal Wallis utilizando el paquete estadístico Sigma Plot 11.0.

6.9.6. Evaluación sobre influencia del consumo de dietas con AgNPs sobre la biodiversidad de la microbiota fecal de *L. vannamei*

6.9.6.1. Protocolo para colecta de muestras

El diseño experimental empleado para la colecta de muestras fue realizado de acuerdo a lo descrito por Narrowe *et al.*, 2015 con modificaciones. Se colocaron 30 organismos (10 por tratamiento) de un peso promedio de 0.80 ± 0.10 gr en jaulas de plástico para su seguimiento individual, los cuales a su vez fueron distribuidos aleatoriamente en 4 bloques dentro de acuarios de fibra de vidrio de 60 L de agua marina sintética 35 ppm, cada bloque fue mantenido en un sistema de recirculación interna de agua ("air-water lift") a un flujo constante de 500 mL por minuto, los parámetros de calidad de agua fueron medidos diariamente (temperatura, salinidad, pH, nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal total). Por otra parte, los organismos fueron alimentados diariamente con tres pellets tres veces al día (9 h, 12 h, 15 h) con dietas adicionadas con AgNPs, se eliminaron heces y restos de alimento antes de cada alimentación diaria (Figura 6).

El ensayo fue dividido en 3 etapas (basal, exposición y depuración) para el muestreo de heces y agua, cada etapa tuvo una duración de 7 días, durante las etapas basal y depuración se suministró la dieta control (0 ppm) para todos los bloques, mientras que durante la exposición se alimentó con cada uno de los tratamientos (Tabla 8) posteriormente al último día de cada etapa, se colectaron heces frescas después de 1-2 h después de haber ofrecido la alimentación. Las heces fueron tomadas minuciosamente del fondo de la jaula con ayuda de pinzas y colocadas en tubos Eppendorf conteniendo 1 mL de alcohol etílico (96 %). Las heces fueron colectadas en un mismo tubo por cada camarón individual por día. Adicionalmente, se colectaron 10 mL de agua de recambio (sucia) por cada bloque y fueron colocados en tubos Falcon con 10 mL de alcohol etílico (96 %). Todas las muestras generadas fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior extracción de ADN.

Tabla 8. Diseño experimental de ensayo

Tratamiento	Organismos por jaula	Replicas
Control (0 ppm)	1	10
T1(10 ppm)	1	10
T2 (100 ppm)	1	10

6.9.6.2. Procesamiento, secuenciación y análisis estadístico de muestras fecales

La identificación de las comunidades microbianas fecales se llevó a cabo utilizando la secuencia de los fragmentos de la región V3 del gen 16S rRNA. El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo con el Anexo 2 y la secuenciación se llevó a cabo con un equipo Illumina MiniSeq en el Laboratorio de Genómica Microbiana del CIAD unidad Mazatlán a cargo del Dr. Bruno Gómez-Gil. Para el análisis estadístico se realizaron comparaciones entre tratamientos y tiempos de muestreo mediante ANOVA múltiple y Tukey-Kramer post hoc ($p > 0.05$), adicionalmente se realizó un análisis alternativo sobre los diferentes bloques de muestreo tomando en cuenta la presencia o ausencia de las AgNPs utilizando t-student ($p > 0.05$), todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa STAMP Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (v.2.0.0). La diversidad de Shannon de las muestras fue calculada con formula (9).

$$H = - \sum_{i=1}^S (p_i * \ln p_i) \quad (9)$$

Donde:

H = diversidad de Shannon; pi = proporción de la población de las especies; i ; s = número de especies en la muestra



Figura 6. Condiciones experimentales de ensayo de metagenómica, a) jaulas individuales, b) bloque compuesto por jaulas distribuidos aleatoriamente, c) heces por coleccionar, d) manejo de organismos durante alimentación y recambio

7. RESULTADOS

7.1. Confirmación de la identidad taxonómica y composición proximal de macroalgas

El genero y especie de cada una de las muestras de algas pardas colectadas en el medio natural, fue confirmada utilizando como referencia las claves taxonomicas y su comparacion con la descripcion de las características fenotípicas (ej. presencia o ausencia de talo, anclaje, estipes y/o estructuras natatorias, tamaño y forma de las frondas y estructuras celulares), en la Figura 7 se muestran las claves taxonomicas utilizadas (i), así como imágenes de cada especie en forma entera (ii), humeda (iii) y troceada previo a la molienda (iv). En el caso de *Ulva clathrata* no se realizó este proceso debido a que a diferencia de las algas pardas el origen de esta fue de un sistema de cultivo a larga escala previamente estandarizado y reportado previamente por Peña-Rodríguez *et al.* 2011.

La composición química de las harinas de alga se muestra en la Tabla 9 (tomada de Múzquiz *et al.* 2019 con modificaciones), se obtuvieron diferencias significativas para todas especies de algas. El contenido de cenizas y carbohidratos (ELN) fueron los compuestos mayoritarios en todas las algas con valores de 22 al 36 y 54 al 66 (%) respectivamente, en donde *E. arborea* fue el alga que presento el contenido más bajo de cenizas pero mayor contenido de carbohidratos con valores de 22.96 ± 0.50^a y 65.35 ± 0.45 (%) respectivamente; *U. clathrata* fue la que presentó el mayor contenido de proteína con 17.80 ± 0.05 (%), mientras que *M. pyrifera* presento el valor más bajo con 4.41 ± 0.04 (%), el resto de las harinas presentaron valores intermedios desde 9 al 12 (%). Todas las algas presentaron valores de lípidos menores a 1 (%) excepto *S. compressa* y *U. clathrata* las cuales mostraron valores de 2.93 ± 0.10 y 1.95 ± 0.05 respectivamente.

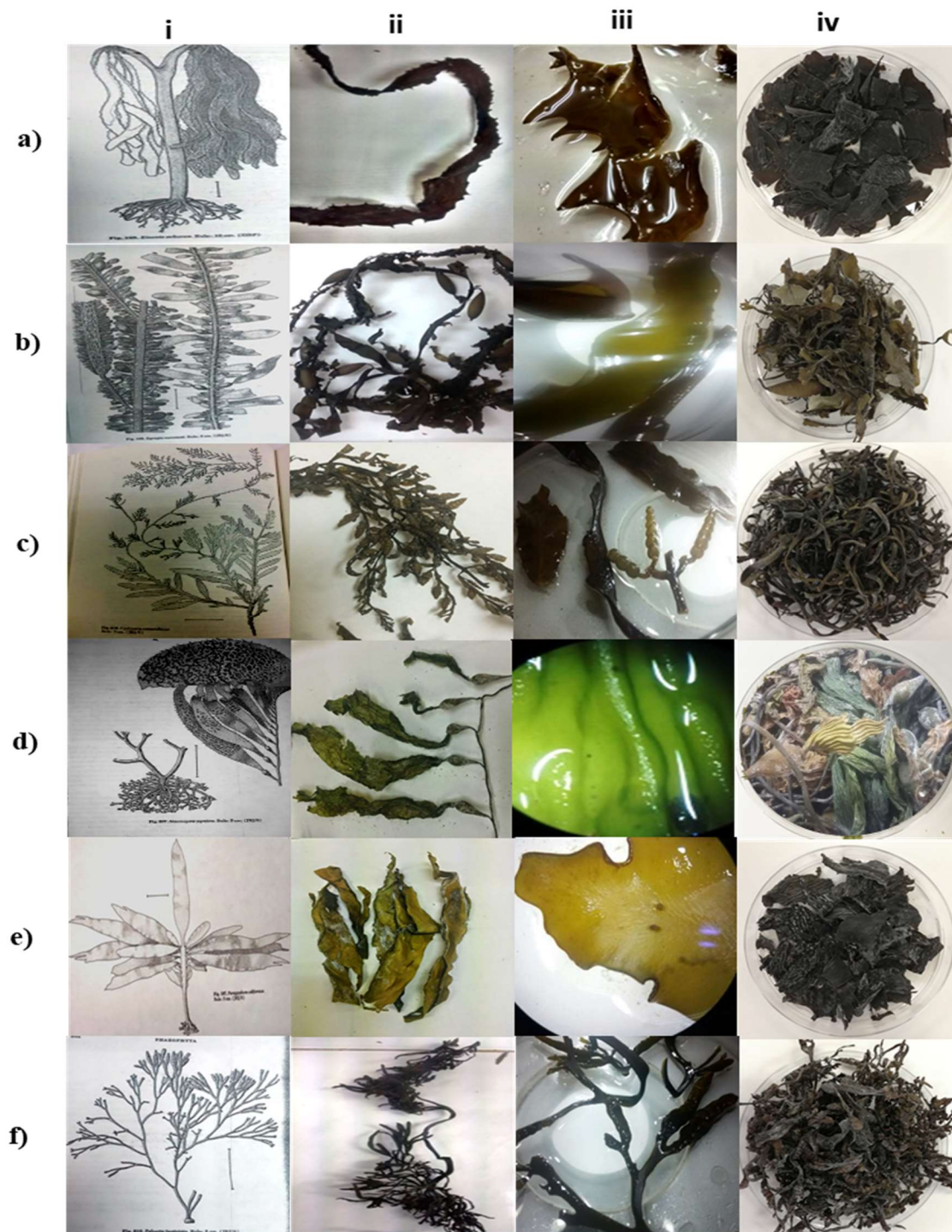


Figura 7. Confirmación de género y especie de algas pardas, (i) clave taxonómica, (ii) especie entera, (iii) húmeda y (iv) troceada previo a la molienda, a) *Ecklonia arborea* (Areschoug 1876), b) *Egregia menziesii* (Turner) (Areschoug 1876), c) *Silvetia compressa* (J. Agardh) (De Toni 1985), d) *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) (C. Agardh 1820), e) *Pterygophora californica* (Ruprecht, 1852), f) *Cystoseira osmundacea* (Turner) (C. Agardh 1820)

Tabla 9. Composición proximal de harina de macroalgas (%)

Alga	Humedad	Cenizas	Lípidos	Proteína	ELN
<i>S. compressa</i>	10.88±0.05 ^b	24.88±0.86 ^b	2.93±0.10 ^d	10.42±0.62 ^{cd}	61.76±0.94 ^c
<i>C. osmundacea</i>	10.56±0.09 ^b	33.89±0.46 ^{de}	1.08±0.07 ^c	9.12±0.11 ^b	55.90±0.30 ^a
<i>E. arborea</i>	9.19±0.28 ^a	22.96±0.50 ^a	0.56±0.12 ^a	11.11±0.42 ^{de}	65.35±0.45 ^d
<i>P. californica</i>	13.44±0.74 ^d	30.10±0.11 ^c	0.55±0.12 ^a	9.60±0.85 ^{bc}	59.74±1.08 ^{bc}
<i>E. menziesii</i>	12.48±0.45 ^{cd}	33.08±0.99 ^d	0.67±0.05 ^a	11.83±0.46 ^c	54.40±1.14 ^a
<i>M. pyrifera</i>	11.55±0.20 ^{bc}	35.61±0.06 ^e	0.59±0.05 ^a	4.41±0.04 ^a	59.38±0.05 ^b
<i>U. clathrata</i>	12.81± 0.05 ^d	24.34±0.07 ^b	1.95±0.05 ^b	17.80±0.05 ^f	55.90±0.19 ^a
F	46.038	127.14	46.830	285.92	75.209
Sig. ANOVA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

ELN Extracto libre de nitrógeno

7.2. Rendimiento de extractos y caracterización

El rendimiento de los extractos acuosos e hidroetanólicos expresado como g de extracto por cada 100 gr de alga BS (%), se muestra en la Figura 8a. El extracto acuoso de *P. californica* obtuvo el mayor rendimiento con 67.56±0.82 (%), mientras que el extracto etanólico de *E. arborea* fue el que obtuvo el mayor rendimiento con 32.29±0.70 (%). El contenido de polisacáridos en los extractos se muestra en la Figura 8b expresado como g de polisacáridos equivalentes a fucosa por cada 100 gr de extracto BS (%), los de *E. arborea* y *U. clathrata* mostraron el mayor contenido de polisacáridos en ambos tipos de extracto con valores de 83.25±0.36 y 48.01±0.57 (%) en los acuosos y de 53.23±2.26 y 29.66±0.88 (%) en etanólicos respectivamente. Finalmente, los extractos de *S. compressa* fueron los que mostraron el mayor contenido de CFT con valores de 27.12±0.19 (acuoso) y 47.70±1.27 (etanólico) g equivalentes a floroglucinol por cada 100 gr de extracto BS (%).

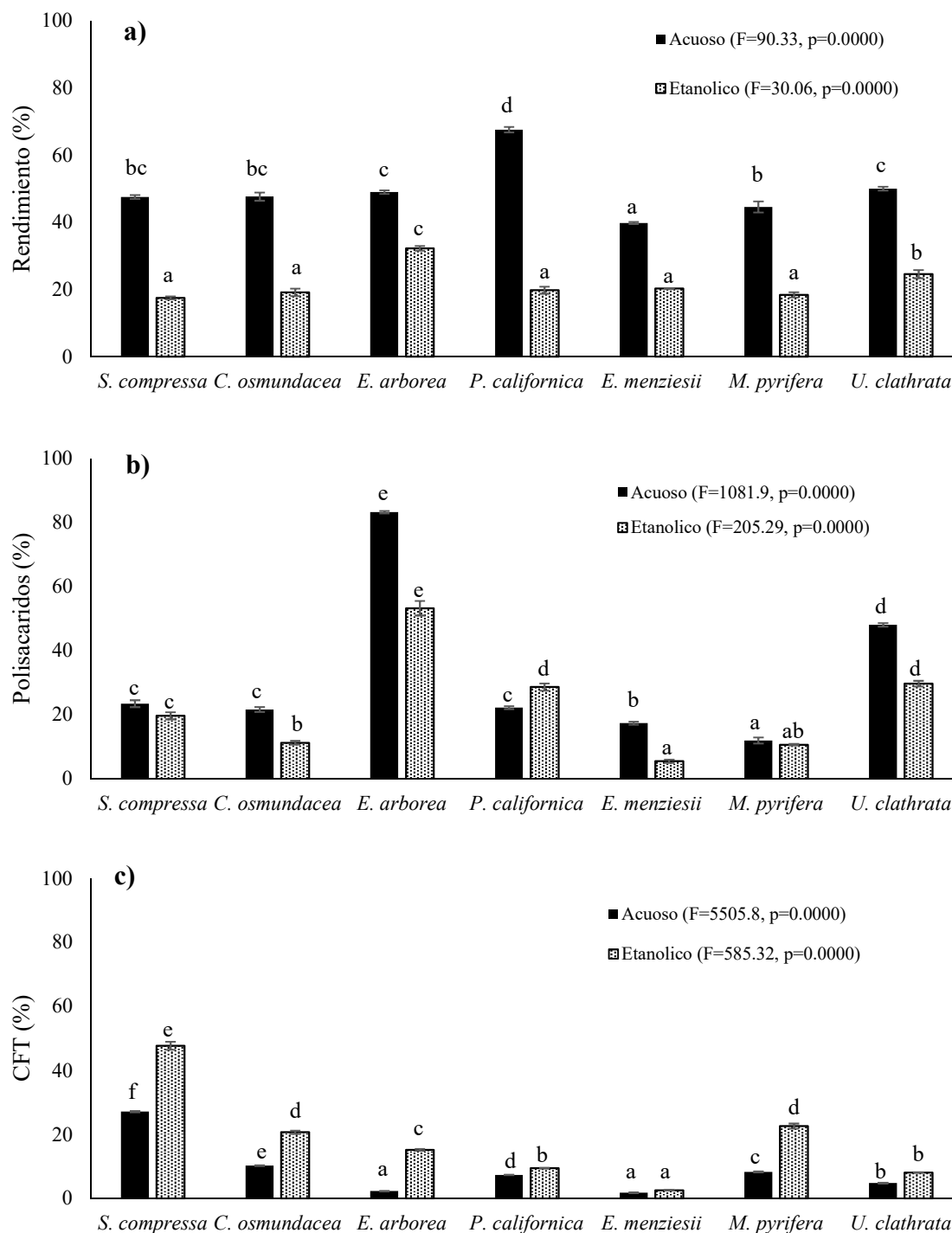


Figura 8. a) Rendimiento (% o g de extracto por cada 100 g de alga en BS) obtenido en extractos acuosos e hidroetanólicos y su contenido de b) polisacáridos (% o g equivalentes a fucosa por cada 100 g de extracto en BS) y c) compuestos fenólicos totales (CFT) (% o g equivalentes a floroglucinol por cada 100 gr de extracto BS)

7.3. Síntesis de nanopartículas

La reducción de Ag^+ a Ag^0 en las muestras se confirmó visualmente mediante un cambio de color desde la solución inicial incolora de AgNO_3 a marrón rojizo después de reaccionar con cada uno de los extractos (Figura 9-15b); de las 14 reacciones propuestas, se obtuvieron 7 estables: 3 con extractos hidroetanólicos (*S. compressa*, *E. arborea* y *C. osmundacea*) y 4 con los extractos acuosos (*U. clathrata*, *S. compressa*, *E. arborea* y *P. californica*); los extractos de las algas *E. menziesii* y *M. pyrifera* no mostraron ningún efecto reductor, dando como resultado soluciones con alta presencia de turbidez y precipitados de color blanco.

En el espectro de absorbancia UV-vis de las muestras donde hubo presencia de AgNPs se observó un pico de absorbancia centrado en el rango de 430-445 nm correspondiente al Plasmón de Resonancia de la Superficie (SPR), las muestras donde no hubo presencia de AgNPs no se registró ningún pico SPR, ver Figuras 9-15 a). Las AgNPs producidas con extractos acuosos fueron visualmente más estables ya que presentaron un mejor efecto reductor basado en producción de color (café- rojizo), menor turbidez y no presentaron precipitación durante las 48 h posteriores a la síntesis (ver Figuras 9-15 b y c). se obtuvieron distribuciones de tamaño de partículas menores que las realizadas con extractos hidroetanólicos (ver Figuras 9-15 e). Finalmente, en todos los casos donde hubo reducción las AgNPs sintetizadas fueron de forma esférica y polimórfica (ver Figuras 9-15 d). La concentración final de Ag en las soluciones de AgNPs purificadas se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentración de Ag en las soluciones de AgNPs purificadas

AgNPs	$\mu\text{g de Ag mL}^{-1}$
<i>S. compressa A</i>	637.5
<i>S. compressa H</i>	280
<i>C. osmundacea H</i>	795
<i>E. arborea A</i>	530
<i>E. arborea H</i>	470
<i>P. californica A</i>	705
<i>U. clathrata A</i>	535

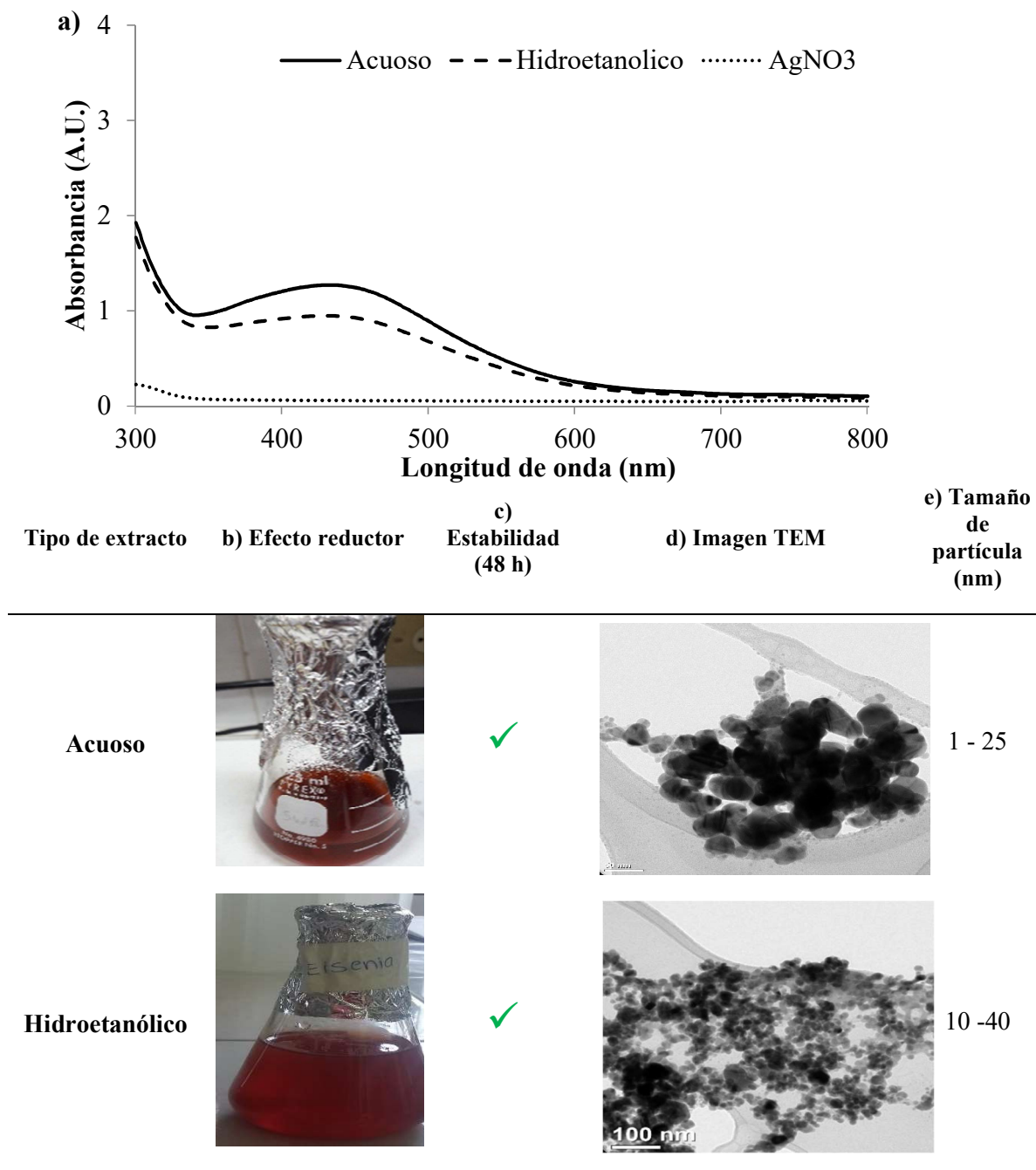
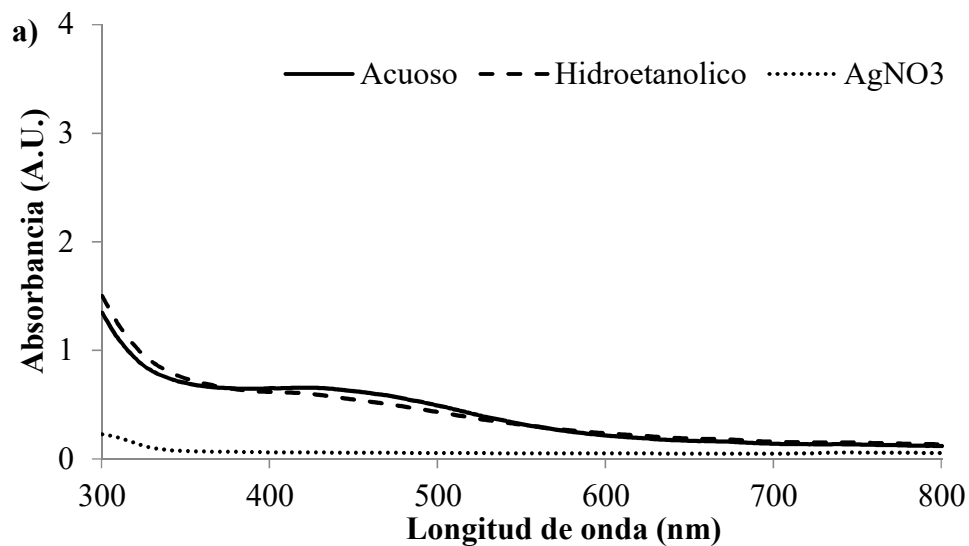


Figura 9. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga *Ecklonia arborea* y AgNO3 inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula obtenido




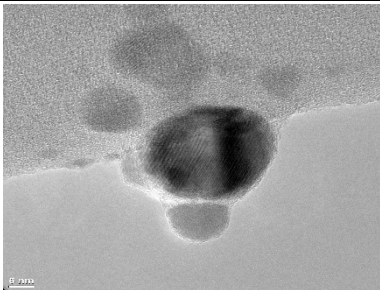

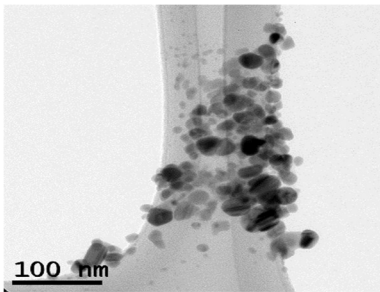
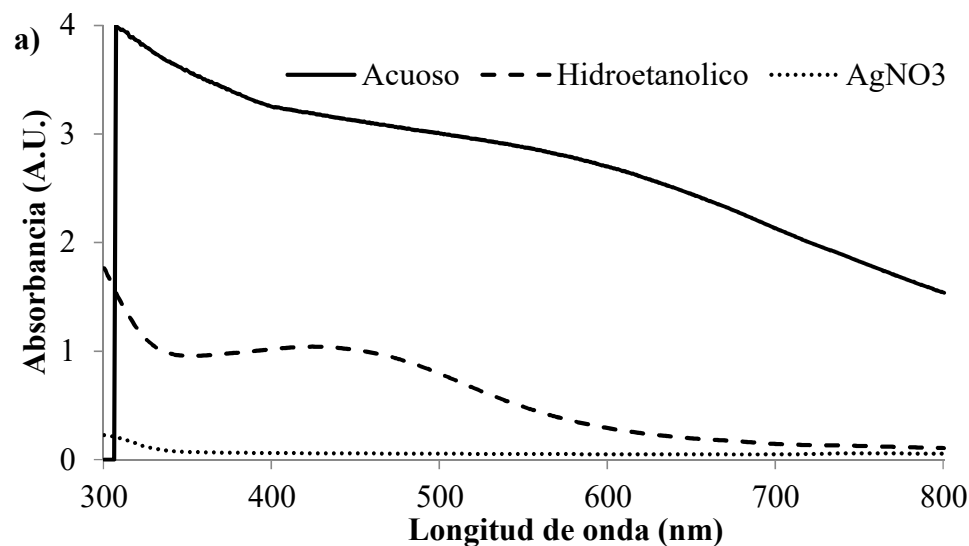
Tipo de extracto	b) Efecto reductor	c) Estabilidad (48 h)	d) Imagen TEM	e) Tamaño de partícula (nm)
Acuoso		✓		1 - 35
Hidroetanólico		✓		10 - 35

Figura 10. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga *Silvetia compressa* y AgNO3 inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula



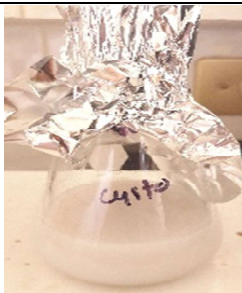

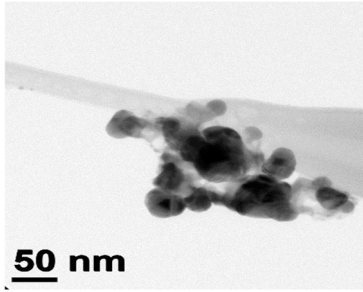
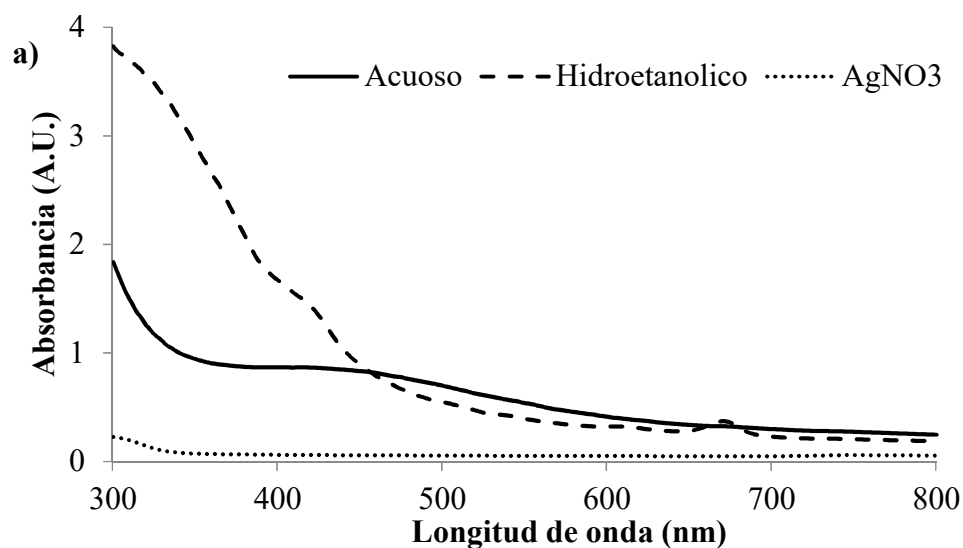
Tipo de extracto	b) Efecto reductor	c) Estabilidad (48 h)	d) Imagen TEM	e) Tamaño de partícula (nm)
Acuoso		✗	ND	ND
Hidroetanólico		✓		1 - 45

Figura 11. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga *Cystoseira osmundacea* y AgNO3 inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado




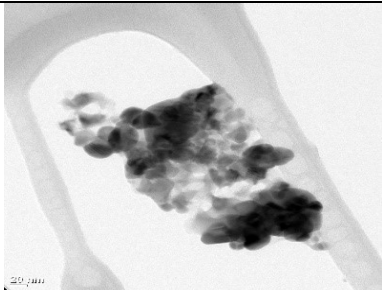

Tipo de extracto	b) Efecto reductor	c) Estabilidad (48 h)	d) Imagen TEM	e) Tamaño de partícula (nm)
Acuoso		✓		10 -70
Hidroetanólico		✗	ND	ND

Figura 12. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga *Pterygophora californica* y AgNO3 inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado

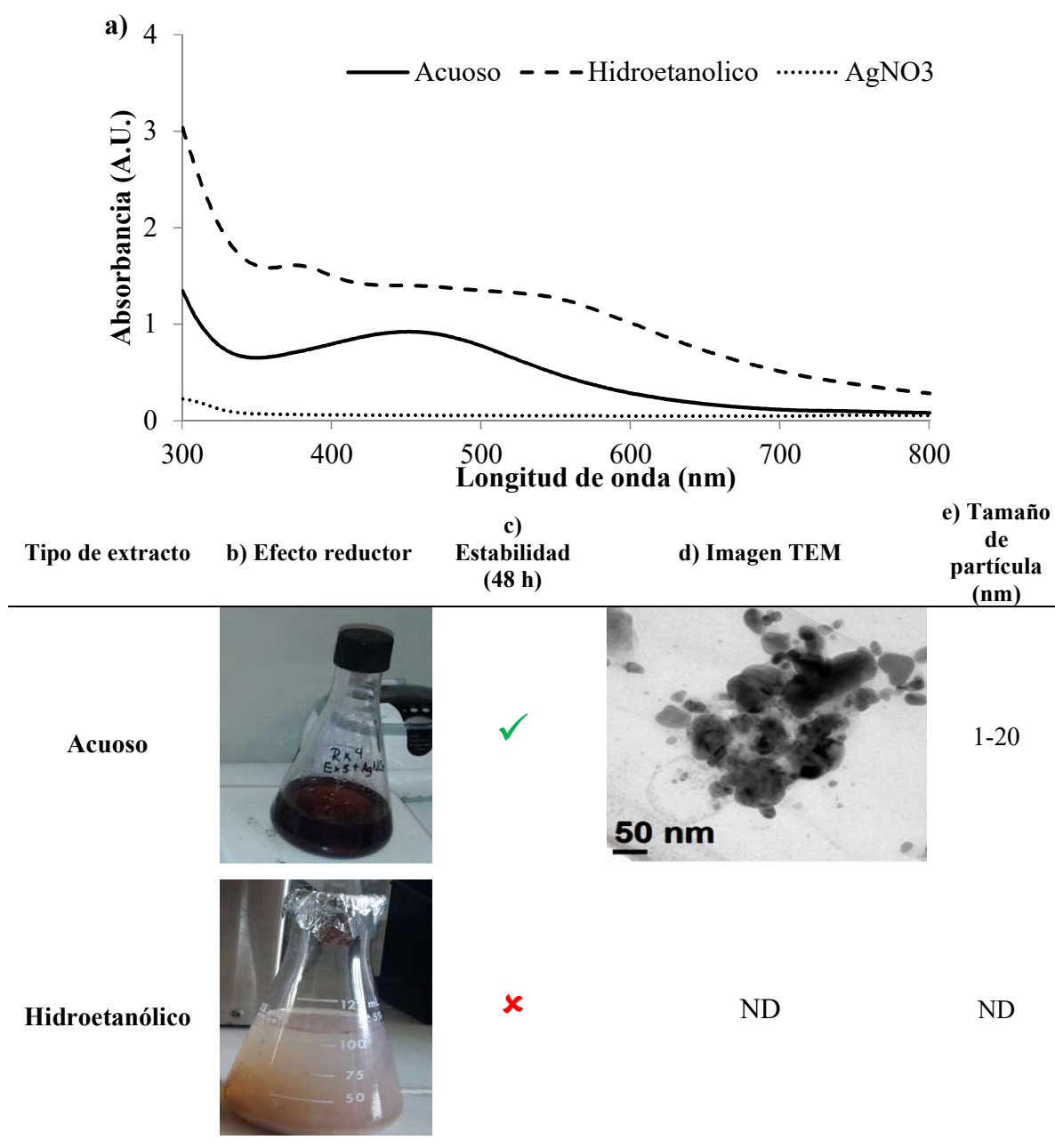
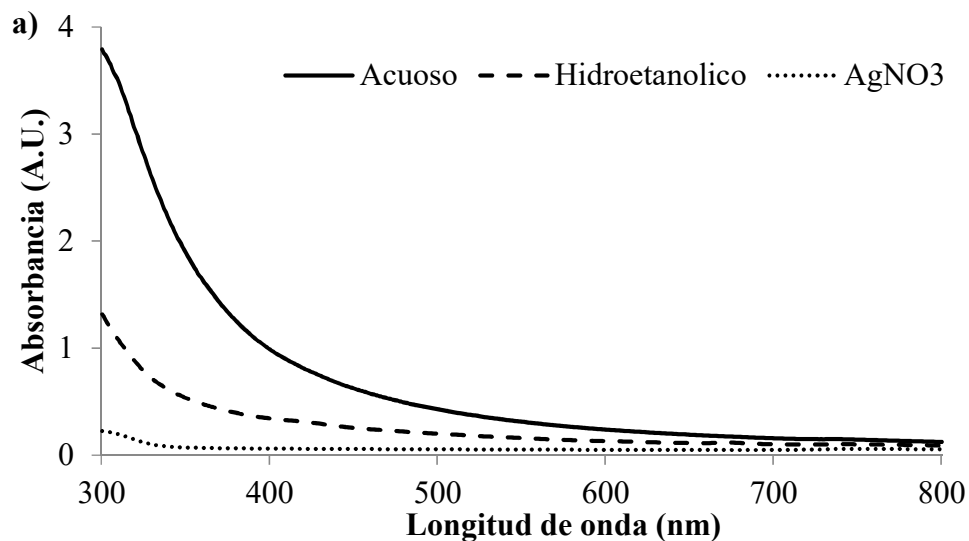


Figura 13. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga *Ulva clathrata* y AgNO₃ inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado





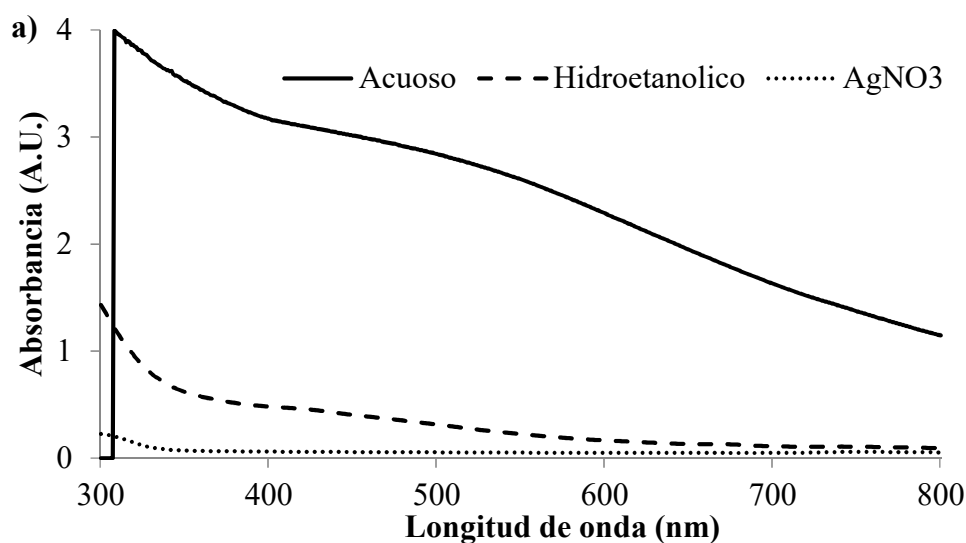
Tipo de extracto	b) Efecto reductor	c) Estabilidad (24 h)	d) Imagen TEM	e) Tamaño de partícula (nm)
Acuoso		×	ND	ND
Hidroetanólico		×	ND	ND

Figura 14. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga *Macrocystis pyrifera* y AgNO3 inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado



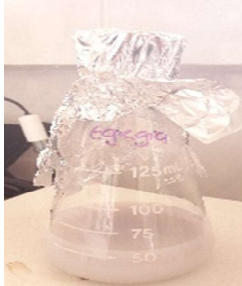

Tipo de extracto	b) Efecto reductor	c) Estabilidad (48 h)	d) Imagen TEM	e) Tamaño de partícula (nm)
Acuoso		×	ND	ND
Hidroetanólico		×	ND	ND

Figura 15. a) Uv- vis de AgNPs sintetizadas con los extractos acuoso e hidroetanólico del alga *Egrecia menziesii* y AgNO3 inicial; características físicas b) efecto reductor y formador de AgNPs del extracto basado en cambio de coloración café-rojizo, c) estabilidad después de 24h de síntesis, d) Imagen de TEM donde se muestra morfología esférica-polimórfica y e) tamaño de partícula; ND no determinado

7.3.1. Caracterización de nanopartículas

Las AgNPs que mostraron mejor actividad antibacteriana *in vitro* (ver punto 7.4) fueron las seleccionadas para la caracterización estructural y de composición superficial. El espectro XRD de la suspensión de AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de *U. clathrata* mostro un patrón de picos de difracción alrededor de 27.7°, 32.1°, 46.1°, 54.8°, 57.4 °, 67.5°, 74.5° y 76.7° (Figura 16). Estos picos muestran una buena coincidencia con las posiciones máximas de referencia de la estructura de fase cúbica centrada (fcc) del cloruro de plata (grupo espacial Fm3m, archivo del Comité Conjunto de Difracción de Potencia (JCPDS) 31-1238). El más intenso de estos picos, que se centra en 32.1°, está asociado al plano (200) de AgCl. Además, se encontraron picos menos intensos y bastante más anchos a aproximadamente 38.1°, 44.3°, 64.4° y 77.5° y se asociaron a los planos cristalinos fcc (111), (200), (220) y (311) de Ag metálica (grupo espacial Fm3m, archivo JCPDS No. 04-0783).

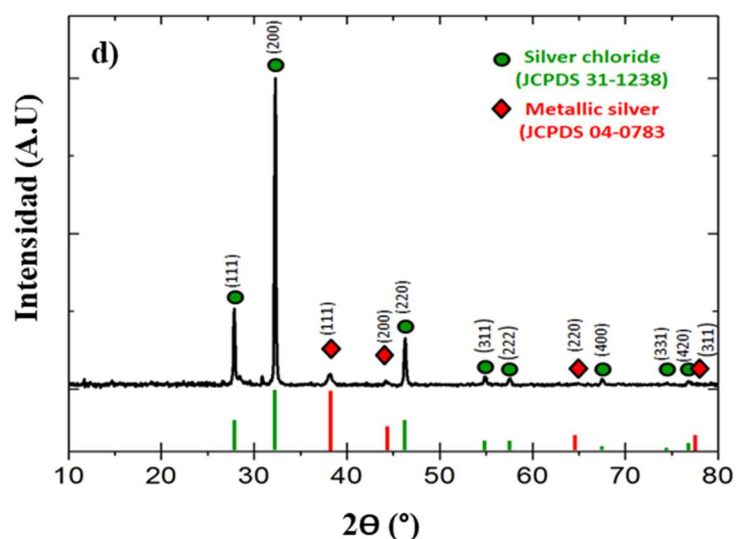


Figura 16. Patrón XRD de AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de *U. clathrata* los picos de difracción coinciden con las posiciones de referencia de estructuras cúbicas centradas en la cara de AgCl (círculos) o Ag metálica (diamantes)

Las imágenes de TEM (Figura 17a) revelaron que la muestra estaba compuesta de partículas esféricas e irregulares con diferentes tamaños, estando el 90(%) en el rango de 5 a 20 nm y el resto de las partículas de 20 a 35 nm. En consecuencia, la distribución del

tamaño de partícula de la muestra se ajustó a una distribución logarítmica normal. El valor central de mejor ajuste del tamaño de partícula y la desviación estándar logarítmica normal fueron 9,5 y 0,44 nm, respectivamente (ver imagen insertada de la Figura 17a).

Los patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) (Figura 17b) exhibieron anillos irregulares asociados a las fases cristalinas de Ag y AgCl de acuerdo con los resultados de XRD. Las imágenes HRTEM de las nanopartículas más pequeñas muestran franjas de celosía asociadas a una fase Ag de fcc pura. El análisis de estas micrografías por FFT reveló diferentes características microestructurales en estas partículas, mostrando que algunas son policristalinas con límites de hermanamiento y fallas de apilamiento (Figura 17c y 17d).

En el espectro FTIR de las AgNPs después del proceso de purificación, presento bandas de absorción principales a 3350 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 1599 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} , 1081 cm^{-1} y 1039 cm^{-1} . La banda ancha a 3350 cm^{-1} atribuida a las vibraciones de estiramiento -O-H fue desplazada con respecto a la misma banda observada en el espectro del extracto de algas. La banda ubicada a 2932 cm^{-1} puede atribuirse a vibraciones de estiramiento -C-H en alcanos (Kora *et al.* 2012). En comparación con el espectro FTIR del extracto acuoso de *U. clathrata* (AEU), apareció una banda de absorbancia mejorada y desplazada a 1599 cm^{-1} , lo que sugiere modificaciones de la vibración de estiramiento C=O y NH en grupos amina o amida debido a la participación de estas partículas en el proceso de reducción (Kannan *et al.* 2013). La banda a 1412 cm^{-1} podría atribuirse a la vibración de estiramiento C-N de grupos amina o amida. Finalmente, la banda de vibración de estiramiento C-N de aminas alifáticas y la vibración de estiramiento C-O-C de los grupos alcohólicos asociados a los polisacáridos (Kumar *et al.* 2012) aparecieron desplazadas a 1081 cm^{-1} y 1039 cm^{-1} respectivamente (Figura 18).

En la Figura 19 se representan los espectros Raman del extracto de algas utilizado en la síntesis y las AgNPs. El espectro de las AgNPs muestra bandas muy pronunciadas a 228 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} y 1595 cm^{-1} que no se observan en el espectro del extracto de algas. La banda afilada a 228 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento de Ag-N (Mukherjee *et al.* 2008; Kora *et al.* 2012) y Ag-O (Biswas *et al.* 2007; Kora *et al.* 2012), lo que sugiere que las proteínas se unen a la superficie de las partículas a través de amino y / o carboxilato

(Kora *et al.*, 2012). Además, se observaron bandas intensas a 1370 cm^{-1} y 1595 cm^{-1} . Dichas bandas se asociaron a vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de C=O de los iones COO⁻ (Kora *et al.* 2012; Luna *et al.* 2015a) respectivamente, y / o estiramiento del anillo de fenilo (Biswas *et al.* 2007; Luna *et al.* 2015a). La mejora de la intensidad de las bandas de vibraciones de estiramiento C=O indica la unión directa del grupo COO⁻ con la superficie Ag (Kora *et al.* 2012).

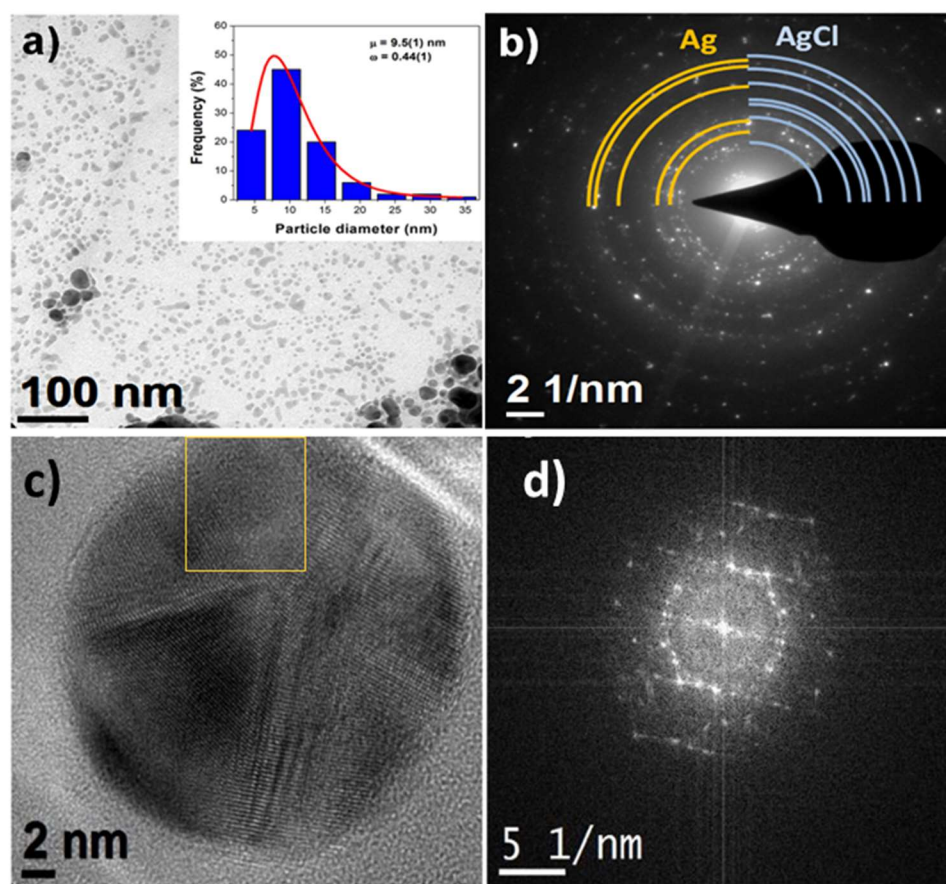


Figura 17. a) Imagen TEM representativa de AgNPs sintetizadas con extracto acuoso de *Ulva*. La imagen de inserción muestra la distribución de tamaño relacionada. La línea roja continua corresponde al mejor ajuste de distribución log-normal. b) Patrón SAED donde se indican las posiciones esperadas de los anillos de difracción asociados a los planos cristalográficos de plata metálica fcc (JCPDS 04-0783) y cloruro de plata (JCPDS 31-1238). c) Imagen HRTEM de AgNPs menor a 15 nm d) Imagen FFT del área resaltada en cuadro amarillo

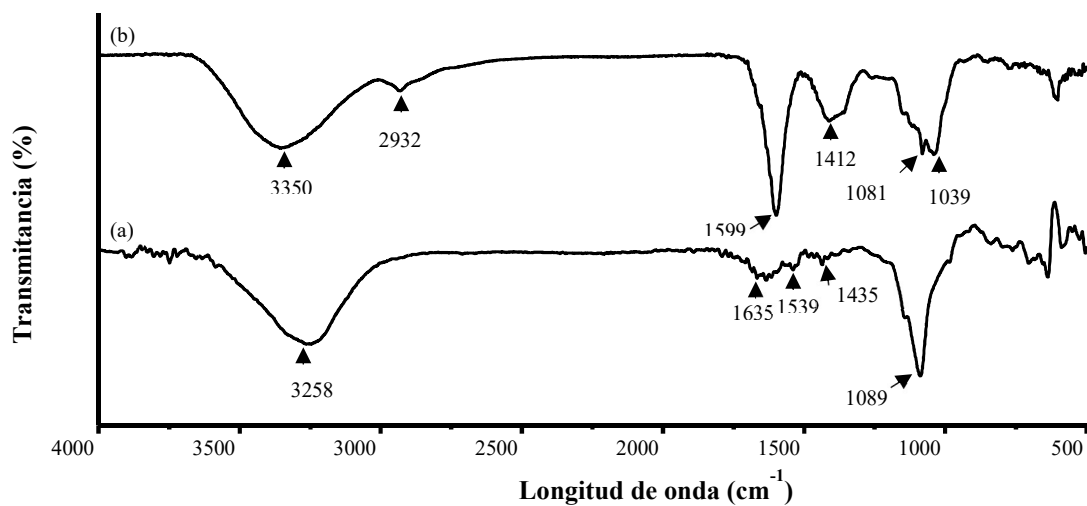


Figura 18. Espectros FTIR de a) extracto acuoso de *Ulva clathrata* y b) AgNPs sintetizadas con el extracto de *Ulva clathrata*

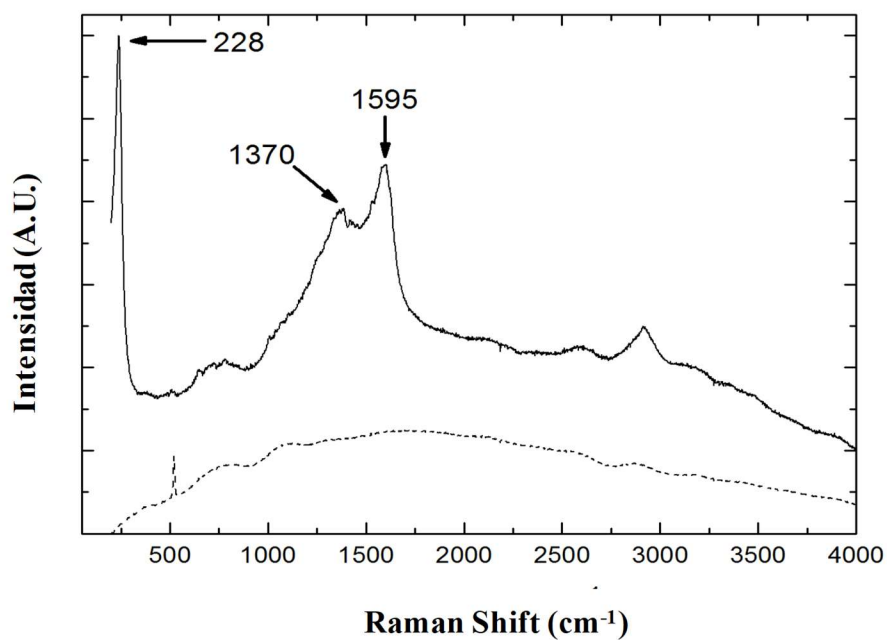


Figura 19. Espectros Raman del extracto de *U. clathrata* (línea punteada) y AgNPs (línea continua)

7.4. Actividad anti-*Vibrio in vitro* de nanopartículas

En la Figura 20 se muestran los valores obtenidos de la actividad antibacteriana evaluada mediante el método de difusión en disco, las AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de *U. clathrata* y el control (AgNO_3) fueron los tratamientos que obtuvieron una mayor IZ comparado con el resto de los tratamientos, se obtuvieron valores promedio de IZ de las cepas evaluadas de 12.41 ± 0.47 y 11.14 ± 0.19 mm para las AgNPs y el AgNO_3 respectivamente; en contraste las AgNPs sintetizadas con extracto acuoso de *P. californica* fueron las menos efectivas con valores promedio de 9.41 ± 0.54 mm de IZ. La cepa M5-28 fue la de mayor susceptibilidad en medio sólido, es decir fue la cepa que obtuvo mayor IZ en todos los tratamientos evaluados con un valor promedio de 11.84 ± 0.37 mm; mientras que el resto de las cepas mostraron valores de IZ muy similares entre los 10 y 10.6 mm. En contraste, los extractos acuosos e hidroetanólicos no mostraron actividad antibacteriana para ninguna de las cepas evaluadas.

Los valores de CMI y CMB se muestran en la Figura 21, la actividad antibacteriana de las AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de *U. clathrata* e medio líquido fueron significativamente similares al control con valores promedio de 4.30 ± 0.38 y 8.40 ± 0.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CMI/CMB respectivamente; en contraste, las AgNPs sintetizadas con el extracto hidroetanólico de *S. compressa* fueron las que presentaron menor efectividad con valores promedio de 10.26 ± 0.81 y 20.53 ± 1.62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CMI/CMB respectivamente. La cepa M5-28 fue la más susceptible en medio líquido con valores promedio de 5.10 ± 0.99 y 10.26 ± 1.52 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CMI/CMB respectivamente. En base a estos resultados se concluyó que para este caso las AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso *U. clathrata* presentan la mejor actividad antibacteriana contra cepas de *Vibrio in vitro* por lo cual fueron seleccionadas para continuar con los posteriores ensayos *in vivo*.

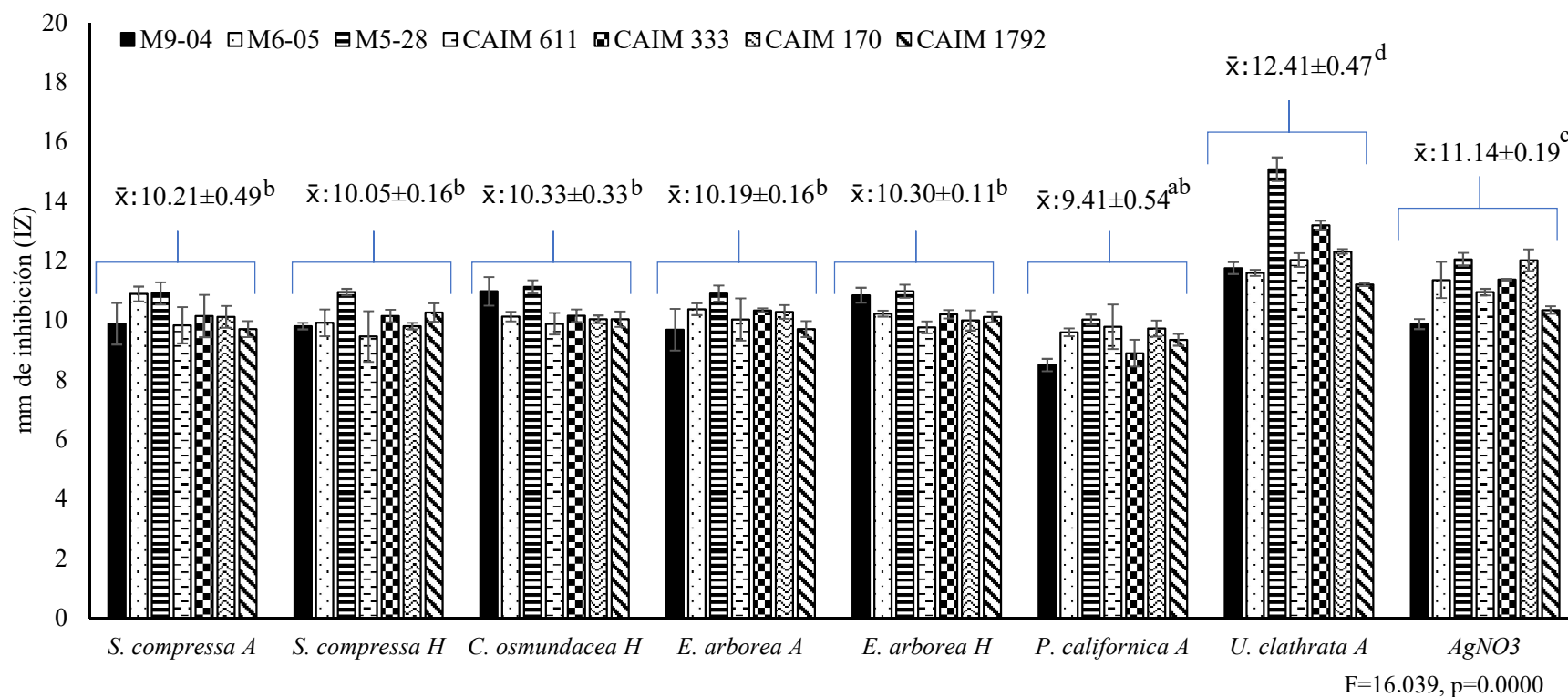


Figura 20. Actividad antibacteriana de AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas mediante difusión en disco Kirby-Bauer, mm de inhibición \pm error estándar, y el valor promedio por tratamiento (\bar{x}) obtenidos a 1 μ g de AgNPs por disco (H: extracto hidroetanólico; A: extracto acuoso). Las letras en superíndice representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de comparación de medias múltiple de Tukey

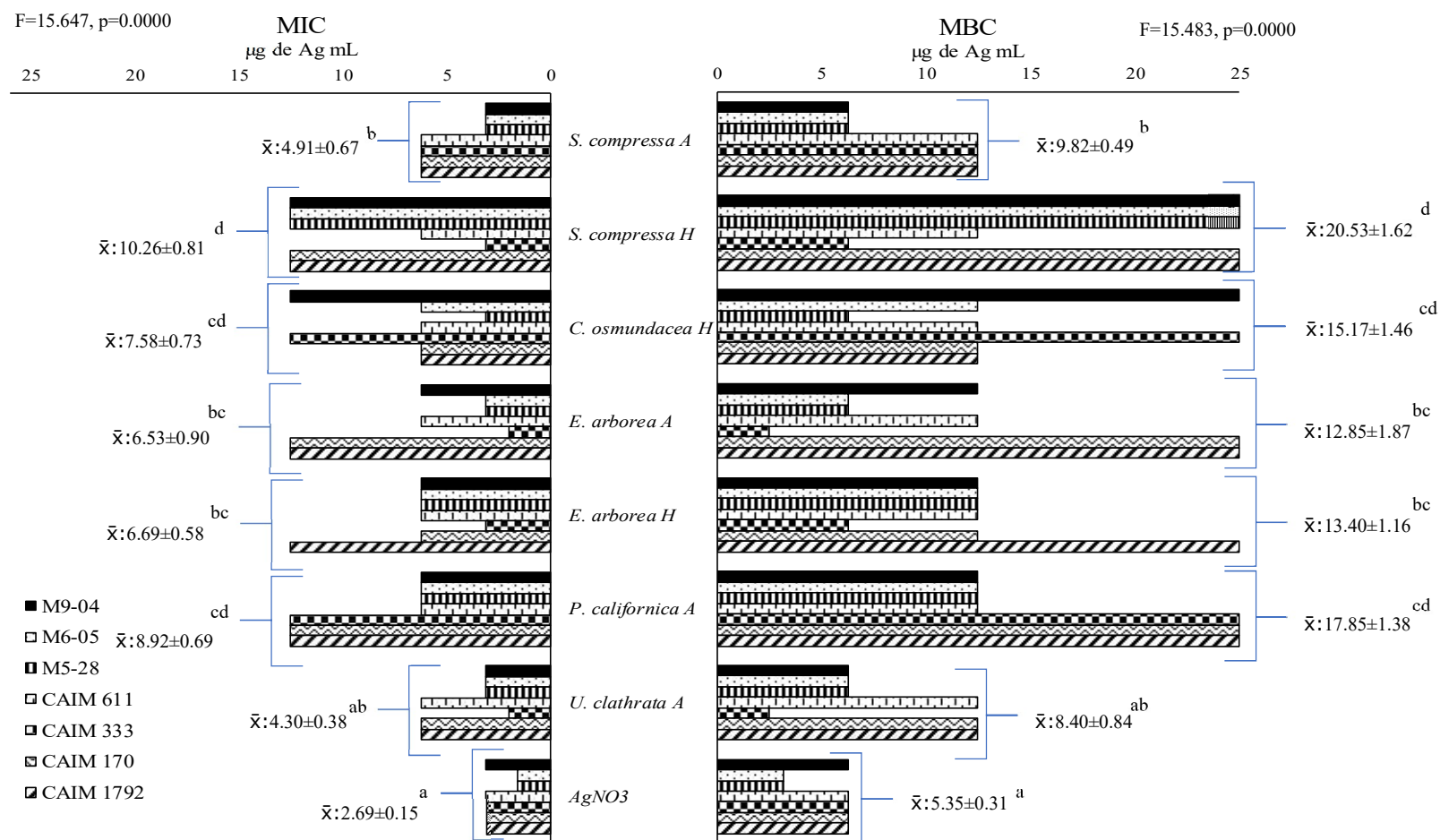


Figura 21. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante microdilución en placa de AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas mexicanas (H: extracto hidroetanólico; A: extracto acuoso), y el valor promedio por tratamiento (\bar{x}). Las letras en superíndice representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de comparación de medias múltiple de Tukey

7.5. Estabilidad de AgNPs en alimentos suplementados

El contenido de Ag en los alimentos experimentales se muestra en la Tabla 11. El alimento lixiviado mostro un mayor contenido de Ag en comparación con contenido inicial del alimento antes de lixiviar. Por otra parte, las AgNPs perdidas de la superficie del alimento al agua de mar después de 1 h fueron inferiores al 5(%).

Tabla 11. Concentraciones de Ag en dietas experimentales y en agua después de la lixiviación (medias \pm desviación estándar, n =3)

Concentración teórica	Concentración real	Concentración en dieta después de lixiviar (mg de Ag kg ⁻¹)	Concentración en agua después de lixiviar (mg de Ag L ⁻¹)
0	< 1	< 1	0.07 \pm 0.03
10	12.73 \pm 1.74	14.08 \pm 0.75	0.14 \pm 0.02
100	85.90 \pm 4.58	90.75 \pm 13.28	0.18 \pm 0.09
1000	827.59 \pm 50.96	936.77 \pm 142.49	0.37 \pm 0.19
10 000	9 971.10 \pm 612.69	10 272.11 \pm 483.34	5.01 \pm 1.50

7.6. Ensayos de toxicidad aguda y crónica

Durante la prueba de toxicidad aguda los organismos no mostraron cambios en el comportamiento y la sobrevivencia fue del 100 (%) para todos los tratamientos. El consumo de alimento suplementado durante 7 días no causó cambios significativos en la tasa de conversión alimenticia, mientras que afecto ligeramente la ganancia en peso (%), el cual mejoro en los camarones que consumieron alimentos suplementados con 10 y 100 mg de Ag kg⁻¹ de alimento y disminuyo en aquellos que consumieron alimentos con 10 000 mg de Ag kg⁻¹ sin embargo este cambio no fue estadísticamente significativo (Tabla 12). Por el contrario, el índice hepatosomático (IPH) mostró una reducción significativa con el consumo de alimentos suplementados con dosis altas (1000 y 10 000 mg Ag kg⁻¹) ver Figura 22.

Tabla 12. Rendimiento de crecimiento de juveniles de *L. vannamei* alimentados durante 7 días con dietas peletizadas suplementadas con dosis nominales de AgNPs (de 0 a 10 000 mg de Ag por kg de alimento, \pm desviación estándar, n=3)

	Dietas experimentales (mg Ag kg ⁻¹)					
Parámetros	0	10	100	1 000	10 000	P
<i>Peso de organismos</i>						
Peso inicial promedio (g)	0.441 ± 0.012	0.444 ± 0.005	0.438 ± 0.002	0.438 ± 0.009	0.440 ± 0.002	0.851
Peso final promedio (g)	0.512 ± 0.010	0.540 ± 0.005	0.534 ± 0.013	0.508 ± 0.011	0.498 ± 0.023	0.232
<i>Consumo de alimento</i>						
Consumo de alimento (g alimento x g camarón ⁻¹ x día ⁻¹)	0.050 ± 0.00	0.050 ± 0.00	0.050 ± 0.00	0.050 ± 0.00	0.050 ± 0.00	1.000
Consumo de AgNPs (mg Ag x g camarón ⁻¹ x día ⁻¹)	0.00 ^a	0.64 ± 0.00 ^a	4.3 ± 0.0 ^b	41.4 ± 0.0 ^c	499.0 ± 0.0 ^d	<0.001
<i>Rendimiento de alimentación y crecimiento</i>						
Ganancia en peso (% WG)	16.1 ± 0.9	21.7 ± 1.0	21.9 ± 2.6	16.0 ± 2.1	13.1 ± 5.1	0.185
Tasa de conversión alimenticia (FCR)	5.0 ± 0.3	3.6± 0.2	3.8 ± 0.5	5.2 ± 0.8	8.1 ± 2.7	0.189
Sobrevivencia (% S)	100	100	100	100	100	0.999

% WG = [(peso promedio final – peso promedio inicial) / peso promedio inicial] * 100; FCR = consumo de alimento total (g) / ganancia en peso (g); % S = (número de organismos vivos / número inicial de organismos por tanque) * 100. Las letras en superíndice representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de medias Tukey.

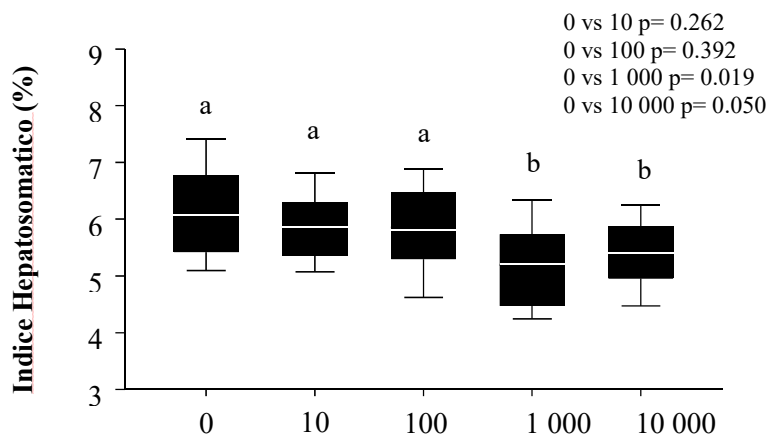


Figura 22. Gráfico de cajas de índice hepatosomático (IPH) después del consumo durante 7 días de alimentos suplementados con AgNPs (de 0 a 1 000 mg de Ag por kg-1 de alimento). La línea blanca representa el valor promedio de IPH, las letras en la parte superior de los cuadros medios indican la ausencia (a) o presencia (b) de una diferencia significativa para el grupo de control (prueba de Dunnet)

En el ensayo de toxicidad crónica la sobrevivencia de los tratamientos fue 80.6 ± 2.8 , 97.2 ± 2.8 , 91.7 ± 0.0 y 77.8 ± 2.8 (%) para los tratamientos de 0, 10, 100 y 1 000 mg de Ag por kg^{-1} de alimento respectivamente. El consumo de alimento suplementado durante 20 días no ocasiono cambios significativos en la tasa de conversión alimenticia, en contraste al ensayo de toxicidad aguda se mostró un efecto significativo sobre la ganancia en peso (%), el cual mejoro en los camarones que consumieron alimentos suplementados con la dosis de 10 y 100 mg de Ag kg^{-1} de alimento y disminuyo en aquellos que consumieron alimentos con 1 000 mg de Ag kg^{-1} (Tabla 13). Para este caso, no se mostraron efectos sobre el índice hepatosomático (IPH) durante los diferentes muestreos, ver Figura 23.

Durante ambos ensayos los parámetros de calidad de agua se mantuvieron constantes la temperatura registrada fue de 30-31°C y pH de 7.9, los parámetros de calidad presentaron valores máximos de 3.9, 0.1, y 5 ppm para NH_3 , NO_2 , y NO_3 respectivamente.

7.7. Distribución de Ag en tejidos

En la Figura 24, se reportan los valores de concentración promedio de Ag para los diferentes órganos analizados al final de los siete días de consumo de alimento suplementado, en los cuales se observó una mayor bioacumulación de Ag en el hepatopáncreas, mostrando una relación dosis-dependiente de hasta 1 500 mg kg^{-1} de peso seco (BS), mientras que las concentraciones en la cutícula y el músculo fueron inferiores a 8 mg kg^{-1} BS. El contenido de Ag en el hepatopáncreas y cutícula fue significativamente diferente a dosis altas (1 000 y 10 000 ppm de Ag). Finalmente, el contenido de Ag de los músculos (parte comestible del organismo) no se afectó significativamente en ningún tratamiento.

Tabla 13. Rendimiento de crecimiento de juveniles de *L. vannamei* alimentados durante 20 días con dietas peletizadas suplementadas con dosis nominales de AgNPs (de 0 a 1 000 mg de Ag por kg de alimento, \pm desviación estándar, n=3)

	Dietas experimentales (mg Ag kg ⁻¹)				
Parámetros	0	10	100	1 000	P
<i>Peso de organismos</i>					
Peso inicial promedio (g)	0.745 ± 0.003	0.711± 0.002	0.725 ± 0.002	0.724 ± 0.002	0.851
Peso final promedio (g)	1.437 ± 0.051	1.441 ± 0.042	1.479 ± 0.025	1.414 ± 0.058	0.232
<i>Consumo de alimento</i>					
Consumo de alimento (g alimento x g camarón ⁻¹ x día ⁻¹)	0.050 ± 0.00	0.050 ± 0.00	0.050 ± 0.00	0.050 ± 0.00	1
Consumo de AgNPs (mg Ag x g camarón ⁻¹ x día ⁻¹)	0.00 ^a	0.64 ± 0.00 ^a	4.3 ± 0.0 ^b	41.4 ± 0.0 ^c	<0.001
<i>Rendimiento de alimentación y crecimiento</i>					
Ganancia en peso (% WG)	96.65 ± 0.39 ^{ab}	100.10± 2.47 ^{ab}	104.27 ± 4.11 ^b	84.88 ± 2.96 ^a	0.029
Tasa de conversión alimenticia (FCR)	1.44± 0.3	1.36 ± 0.2	1.32 ± 0.5	1.44 ± 0.8	0.269
Sobrevivencia (% S)	80.6 ± 2.8 ^{ab}	97.2± 2.8 ^{bc}	91.7± 0.0 ^c	77.8 ± 2.8 ^a	0.003

% WG = [(peso promedio final – peso promedio inicial) / peso promedio inicial] * 100; FCR = consumo de alimento total (g) / ganancia en peso (g); % S = (número de organismos vivos / número inicial de organismos por tanque) * 100. Las letras en superíndice representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de medias Tukey.

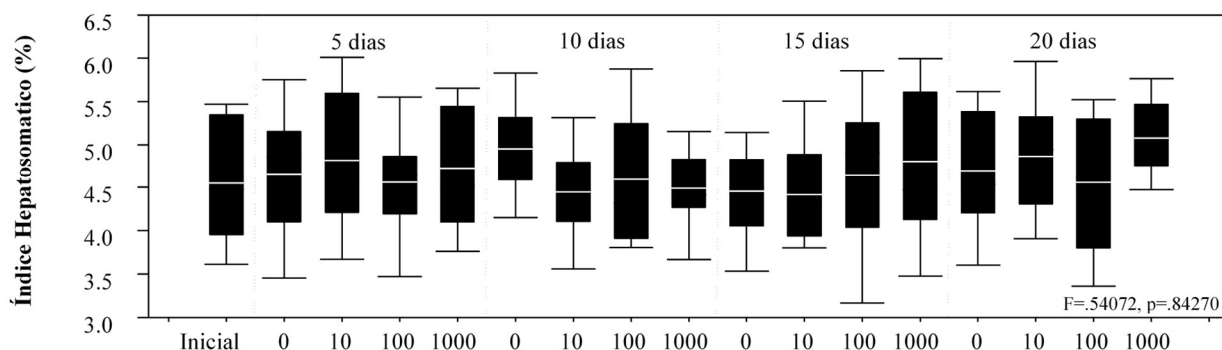


Figura 23. Gráfico de cajas de índice hepatosomático (IPH) después del consumo durante 20 días de alimentos suplementados con AgNPs (de 0 a 1 000 mg de Ag por kg-1 de alimento). La línea blanca representa el valor promedio de IPH

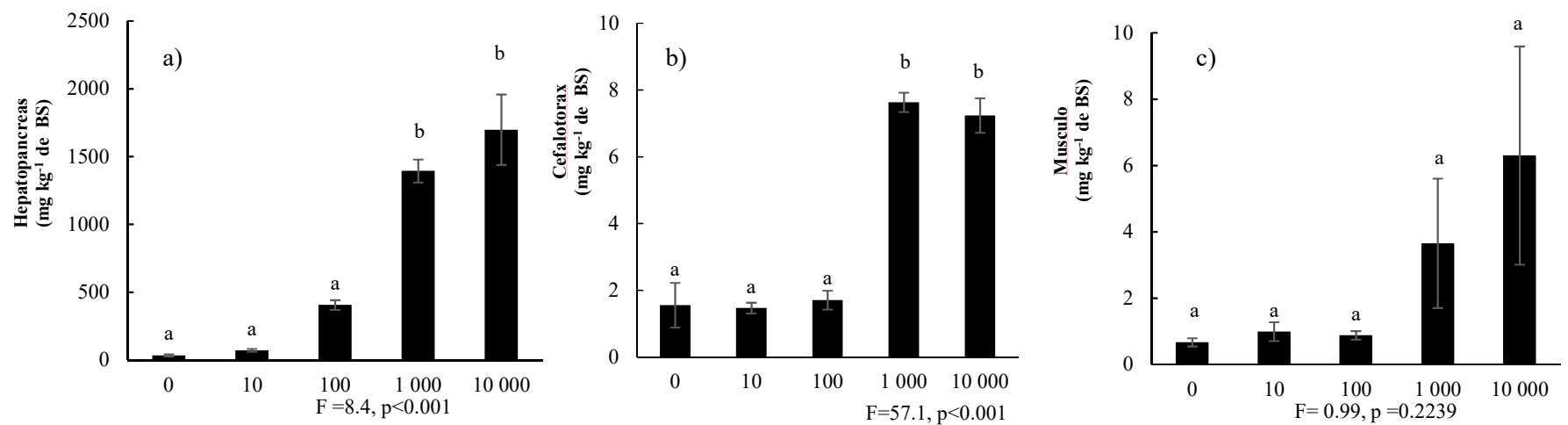
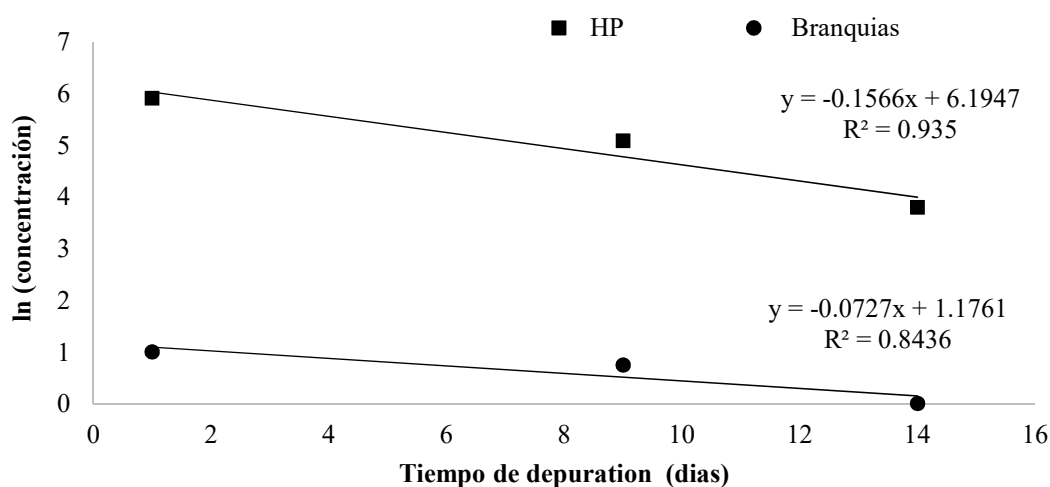


Figura 24. Bioacumulación de Ag en tejidos de camarones en a) hepatopáncreas, b) cutícula de cefalotórax y c) músculo, después del consumo durante 7 días de alimentos suplementados con AgNPs (de 0 a 10 000 mg de Ag por kg⁻¹ de alimento). Las letras en la parte superior de las barras de las columnas indican diferentes subconjuntos homogéneos según lo determinado por una prueba de comparación de medias múltiples de Tukey; las barras de error representan la SD en todas las figuras

7.8. Parámetros de depuración

La tasa de depuración (k_2), (%) de asimilación (α), el tiempo de depuración del 50% o vida media ($t_{1/2}$) y el factor de biomagnificación (BMF) fueron posibles de determinar solo para hepatopáncreas y branquias (Figura 25). El modelo utilizado para calcular los parámetros de depuración no fue aplicable en el tejido muscular debido a las bajas concentraciones de Ag reportadas. Sin embargo, los resultados indicaron que para el hepatopáncreas se obtuvieron valores de k_2 y α más altos (0.156 día^{-1} y 33.053, respectivamente) que las branquias (0.072 día^{-1} y 0.169). Mientras que el $t_{1/2}$ fue más corto en las branquias que en el hepatopáncreas con valores de 4,4 y 9,5 días respectivamente. En cuanto al FMF se obtuvieron valores de 10.553 y 0.116 para hepatopáncreas branquias respectivamente. Finalmente, la depuración de Ag acumulada en hepatopáncreas y branquias fue de 89 y 99(%) respectivamente, después de 14 días de depuración (alimentación con dieta control).



Tejido	Tasa de depuración K_2 (día^{-1})	Asimilación α_g (%)	$t_{1/2}$ (día)	FMF (L kg^{-1})
Branquias	0.072	0.169	9.534	0.116
Hepatopáncreas	0.156	33.053	4.426	10.553

Figura 25. Cinética del modelo de depuración ln (concentración) del contenido de Ag en branquias y hepatopáncreas

7.9. Efectos en histología

Durante el ensayo de histología en general los organismos presentaron un buen consumo de alimento, no se presentaron síntomas de enfermedad, actividad natatoria normal, el color de los HP disectados fue variado desde café rojizo oscuro hasta pálido rosáceo y de tamaño normal (Figura 26). En los tiempos 5, 10 y 15 los camarones correspondientes al D1 en los acuarios mostraron un mayor número de cromatóforos expandidos en comparación con los demás tratamientos, pero al final del ensayo no mostraron diferencias visuales aparentes.

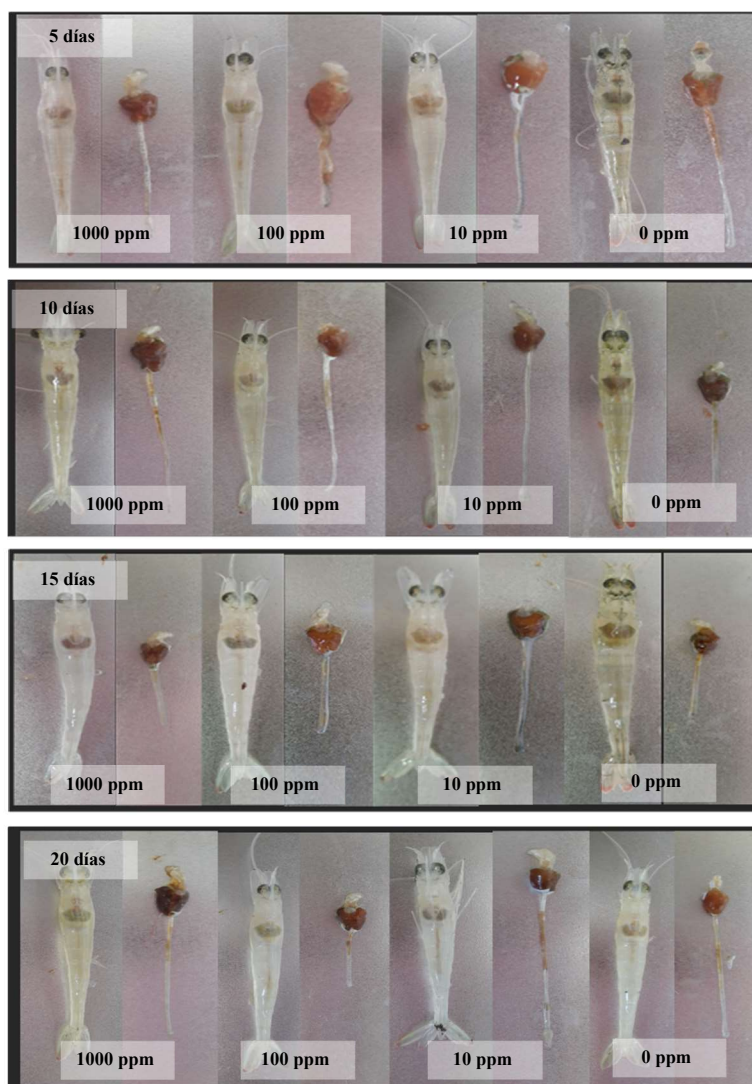


Figura 26. Disección de tractos digestivos completos de organismos a los días 5, 10, 15 y 20 de alimentación con alimentos suplementados con AgNPs (de 0 a 10 000 mg de Ag por kg⁻¹ de alimento)

El análisis histopatológico realizado a las muestras de HP colectados al inicio de la experimentación (Día 0) reveló que 8/12 organismos mostraron un hepatopáncreas con una estructura tubular normal, no obstante, se observó un epitelio tubular con diferentes tamaños de vacuolas en células R (Figura 27a-c), infiltración hemocítica focal en espacios intertubular y formación de estructuras vermiformes en el lumen de algunos túbulos. En 3/12 HP se registró ligera reducción en el tamaño de vacuolas en células R (Figura 27a) y 5/12 presentaron un mayor grado de reducción en el tamaño de vacuolas en células R (Figura 27b). El resto de los HP mostraron un epitelio adelgazado y ausente de vacuolas en células R (Figura 27c) y disminución de vacuolas de células B.

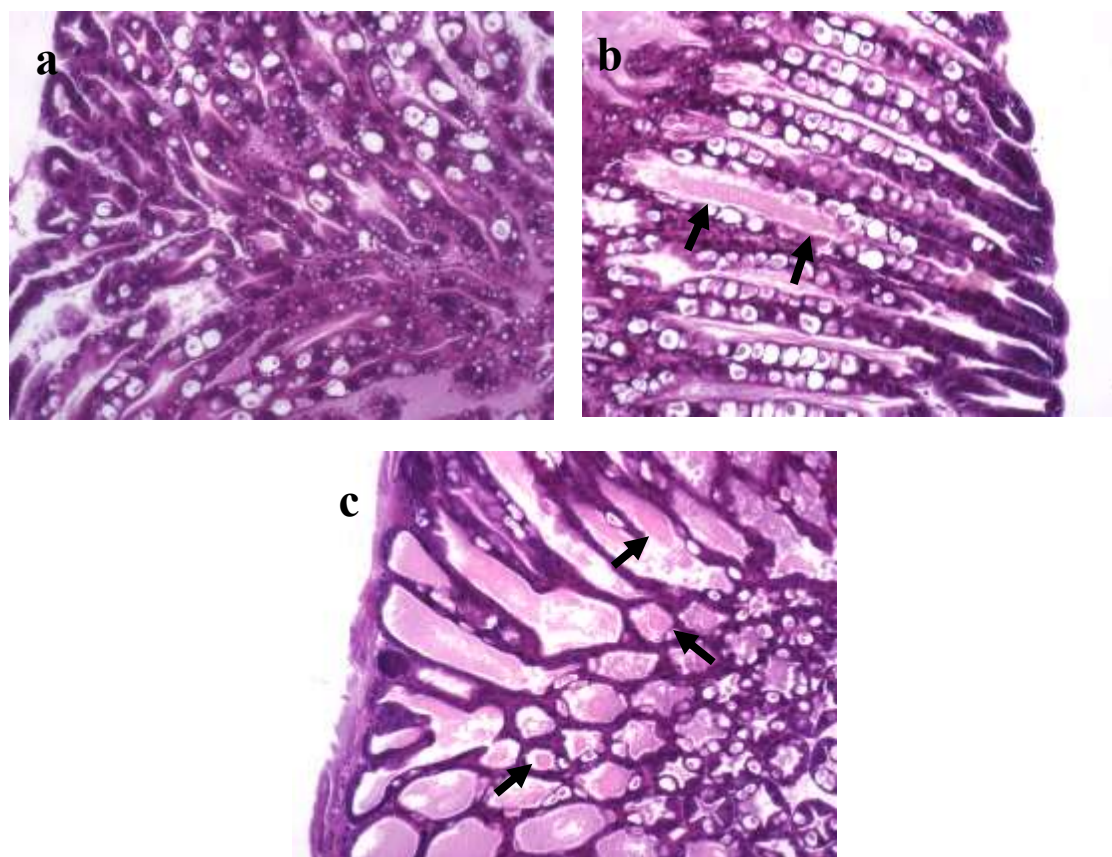


Figura 27. Microfotografía de hepatopáncreas (HP) de camarón *L. vannamei* al día 0 de alimentación con la dietas experimental. a. y b. Corte de túbulos del HP, donde se observa reducción de vacuolas en células R. c. Túbulos de HP donde se muestra un epitelio adelgazado ausente de vacuolas y formación de estructuras vermiformes (flecha) en el lumen de algunos túbulos. Tinción hematoxilina eosina-floxina (H&E)

Por otro lado, los HP de organismos alimentados con la dieta control (0 ppm de AgNPs) al día 20, mostraron 7/9 organismos un epitelio tubular con reducción en el tamaño de vacuolas en células R, infiltración hemocítica ligera en espacios intertubulares (Figura 29a) y en 2/9 Hp presentaron en algunos túbulos elongación de células epiteliales y células necróticas en el lumen tubular (Figura 28b). En adición todos los organismos del este tratamiento mostraron algunas células picnóticas en el epitelio tubular.

Los organismos del tratamiento con inclusión de 10 ppm de AgNPs por su parte, exhibieron en 4/9 organismos un HP con mayor tamaño de vacuolas en células R, sin embargo, en la mayoría de los HP se observó infiltración hemocítica ligera y formación de estructuras vermiformes en algunos túbulos. El resto de los organismos (5/9 HP) presentaron un epitelio tubular con reducción de vacuolas en células R (Figura 28d).

En las muestras del tratamiento de 100 ppm de AgNPs, se observó en 2/9 organismos necrosis tubular con capsulas hemocíticas asociado a la proliferación de bacterias en el lumen tubular (Figura 28e). En 6/9 HP se observó un epitelio tubular con reducción en el tamaño de vacuolas, núcleos picnóticos; ausencia de vacuolas en las células R en algunos túbulos (Figura 28f) e infiltración hemocítica ligera en tejido intertubular. Sólo un organismo presentó un mayor tamaño de vacuolas en células R similar la observado en el tratamiento 10 ppm (ver, Figura 28c).

Los organismos procedentes del tratamiento alimentado con 1000 ppm de AgNPs mostraron un mayor número de organismos con lesiones necróticas en epitelio tubular. Se observó en 1/9 HP capsulas hemocíticas similar a las observados en el tratamiento de 100 ppm y en 4/9 HP mostraron elongación de células epiteliales en algunos túbulos similar a lo observado en el tratamiento control (ver, Figura 28b). Todos los Hp de este tratamiento presentaron reducción en el tamaño de vacuolas en células R, infiltración hemocítica ligera en tejido intertubular, sólo un organismo mostró infiltración hemocítica severa (Figura 28h). En 6/9 organismos se observaron núcleos picnóticos en epitelio tubular coincidiendo también con lo registrado en el tratamiento de 100 ppm.

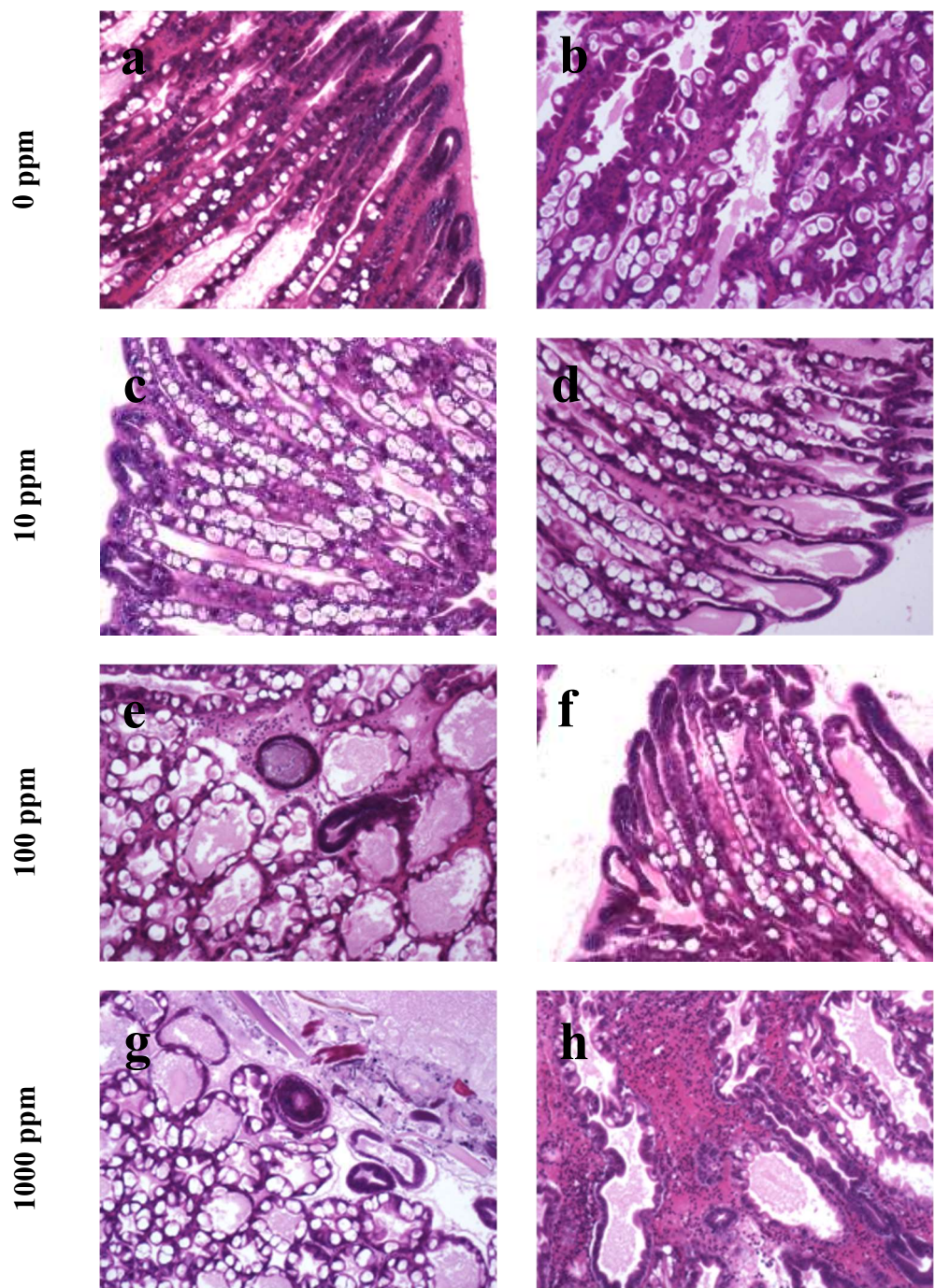


Figura 28. Microfotografía de hepatopáncreas (HP) de camarón *L. vannamei* al día 20 de alimentación con las dietas experimentales (0, 10, 100 y 1000 ppm de AgNPs). a. Tratamiento control con 0 ppm de AgNPs; b. Tratamiento con 10 ppm de AgNPs; c. Tratamiento con 100 ppm de AgNPs; d. T Tratamiento con 1000 ppm de AgNPs. Tinción H&E

En cuanto el análisis estadístico realizado el tratamiento de 10 ppm mostró reducción significativa de la presencia de células picnóticas (RR 0.111, $p \leq 0.001$) en comparación con los demás tratamientos; mientras que el tratamiento de 1 000 ppm mostró un aumento significativo de lesiones necróticas severas (RR 4.5, $p \leq 0.002$), ver Figura 29.

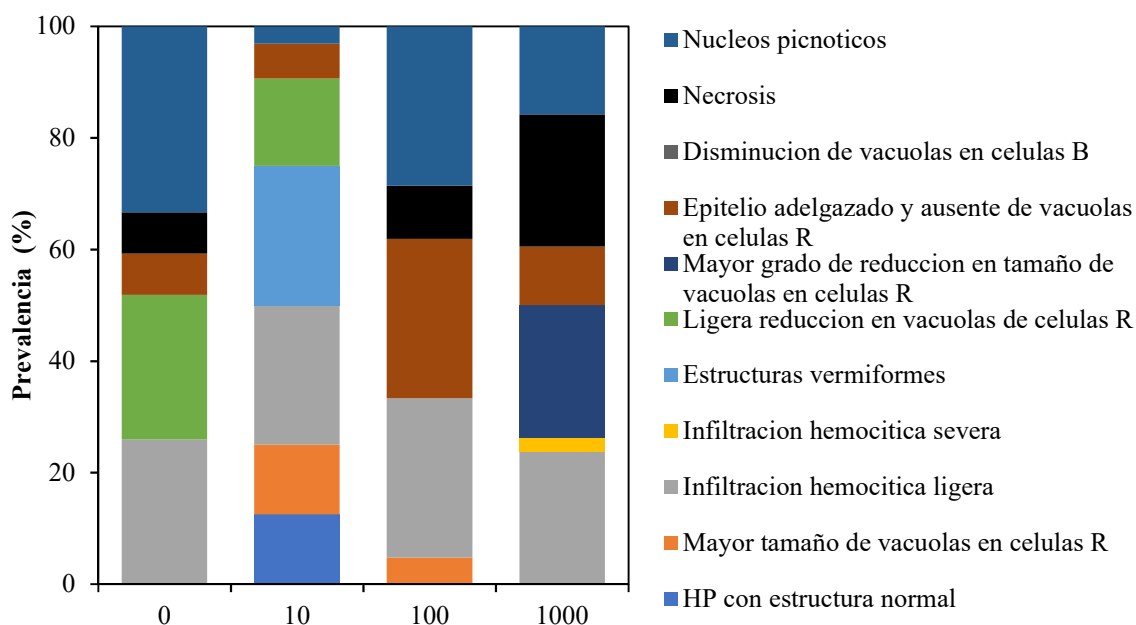


Figura 29. Prevalencia (%) de observaciones histológicas de hepatopáncreas (HP) de camarón *L. vannamei* al día 20 de alimentación con las dietas experimentales (0, 10, 100 y 1000 ppm de AgNPs)

7.10. Desafío bacteriano

Durante la etapa de alimentación los organismos presentaron consumo total de alimento y no se presentaron mortalidades; la temperatura registrada fue de 30°C y pH de 7.9, los parámetros de calidad presentaron valores máximos de 3.9, 0.1, y 5 ppm para NH₃, NO₂, y NO₃ respectivamente. La duración del ensayo fue de 108 hpi, la primera mortalidad fue registrada a las 7 hpi en el tratamiento TEST+, a las 9 hpi los organismos de todos los tratamientos infectados (+) presentaron en general, aletargamiento, nado errático, cromatóforos expandidos, intestino vacío palidez en el cuerpo, el hepatopáncreas rojizo y en algunos casos necrosis, durante la alimentación a este tiempo no se mostró consumo por lo que en los acuarios se observó restos de la mayoría del alimento suministrado. La

mayor frecuencia de mortalidad se presentó entre las 11 y 22 horas, siendo el TEST+, 0 y 10 ppm los tratamientos con mayor mortalidad, a las 36 hpi los organismos mostraron una notable recuperación ya que presentaron una mayor actividad sensible al movimiento, además de tracto intestinal lleno y buen consumo de alimento. De las 48 a las 108 hpi la mortalidad se mostró reducida notablemente, presentando solo mortalidades aisladas y los camarones presentaron signos de melanización en cutícula y musculo, también presentaron golpes en el cuerpo ya que los organismos se vieron alterados y con movimiento excesivo, esto puede ser atribuido al estrés de las condiciones experimentales. En la Figura 30 se muestran organismos sobrevivientes tomados al azar a las 108 hpi, en los tratamientos infectados se observa un HP notablemente reducido, pálido, friable y tracto vacío, mientras que en los tratamientos no infectados se observa una coloración normal, tracto lleno y sano.

La sobrevivencia acumulada fue de 100 (%) para los tratamientos no infectados, seguido del tratamiento de 100, 10 y 0 ppm con valores de 78 ± 7 , 57 ± 9 y 46.7 ± 7 (%) respectivamente; mientras que la sobre el TEST+ fue de 26.7 ± 7 (%). El análisis de Holm-Sidak sobre las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier (Log sobrevivencia) mostro diferencias significativas entre los tratamientos infectados y no infectados, así como también el tratamiento de 100 ppm mostró una diferencia significativa con el tratamiento TEST+(Figura 31).



Figura 30. Organismos *L. vannamei* sobrevivientes y sus tractos digestivos disectados a las 108 hpi al término del ensayo infeccioso con un inóculo de 10^9 UFC ml^{-1} de Vp M9-04 AHPND+

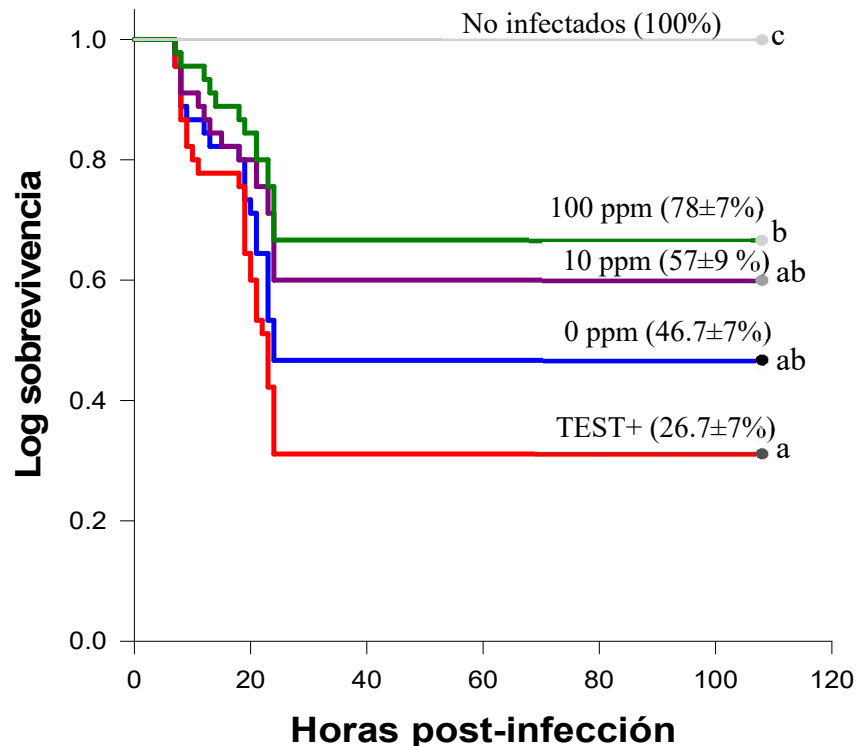


Figura 31. Análisis de la sobrevivencia por Kaplan-Meier de organismos *L. vannamei* alimentados con dietas adicionadas con 0, 10 y 100 ppm de AgNPs y una dieta comercial (TEST) desafiados con Vp M9-04 AHPND+. Los valores entre paréntesis representan la sobrevivencia (%) ±SD, las letras representan diferencias significativas entre tratamientos estimados por el análisis Holm-Sidak ($P < 0.001$)

7.11. Efecto del consumo de dietas adicionadas con AgNPs sobre la biodiversidad de la microbiota fecal de *L. vannamei*

Se obtuvieron un total de 76 muestras (heces, agua y alimento) de las cuales solo se logró solo la amplificación de 68. Se encontraron un total de 721 OTUs a nivel género, de los cuales *Vibrio*, *Photobacterium* y *Pseudoalteromonas* fueron los más abundantes respectivamente (Figura 32). Por otra parte, se encontraron 1058 tipos diferentes de especies, donde *V. hyugaensis* y *V. inhibens*, *P. damsela*, así como *P. spongiae* y *P. luteoviolacea* fueron las cepas de los géneros más abundantes respectivamente (Figura 33).

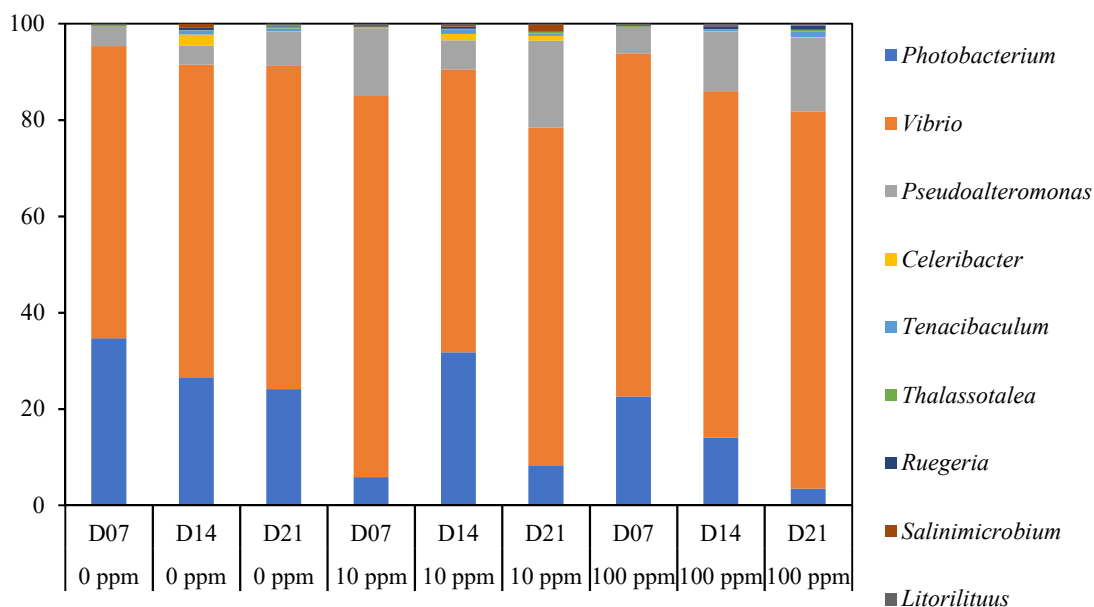


Figura 32. Abundancia relativa de OTUs a nivel genero de microbioma de fecal promedio de organismos *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con AgNPs (0, 10 y 100 ppm). D07: aclimatación, D14: exposición, D21: depuración

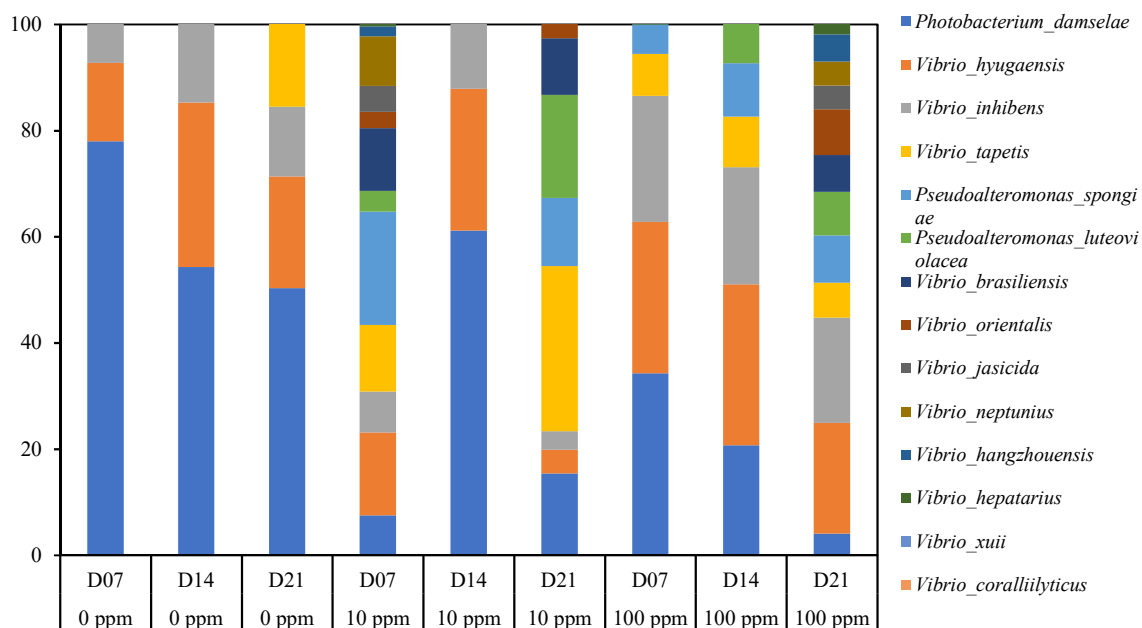


Figura 33. Abundancias relativas OTUs a nivel especie de microbioma de fecal promedio de organismos *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con AgNPs (0, 10 y 100 ppm). D07: aclimatación, D14: exposición, D21: depuración

En este estudio se encontró que el consumo de AgNPs vía dietaria no modificó significativamente la diversidad del microbioma fecal en ninguno de los tratamientos ni tiempos de muestreo (Figura 34). Al realizar un análisis estadístico alternativo tomando en cuenta la presencia o ausencia de las AgNPs y se encontraron cambios significativos a nivel especie para *P. luteoviolacea* en la comparación 0 vs 10 ppm; mientras que *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* y *Tropicibacter multivorans* en la comparación 0 vs 100 ppm (Figura 35).

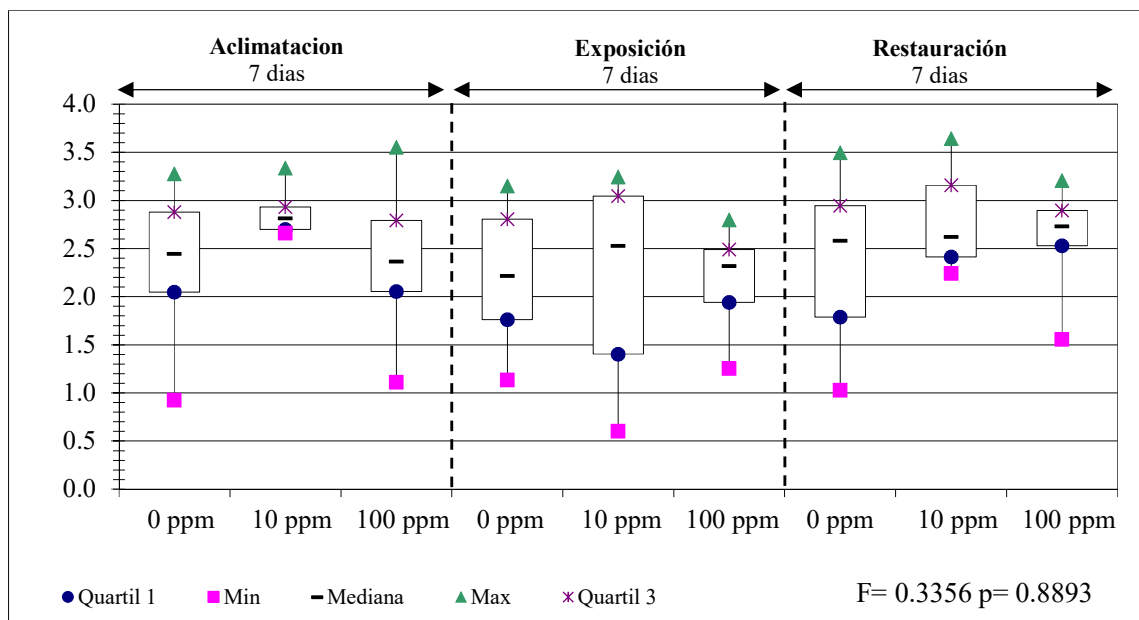


Figura 34. Diversidad en el microbioma fecal (índice de Shannon) de organismos *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con AgNPs (0, 10 y 100 ppm)

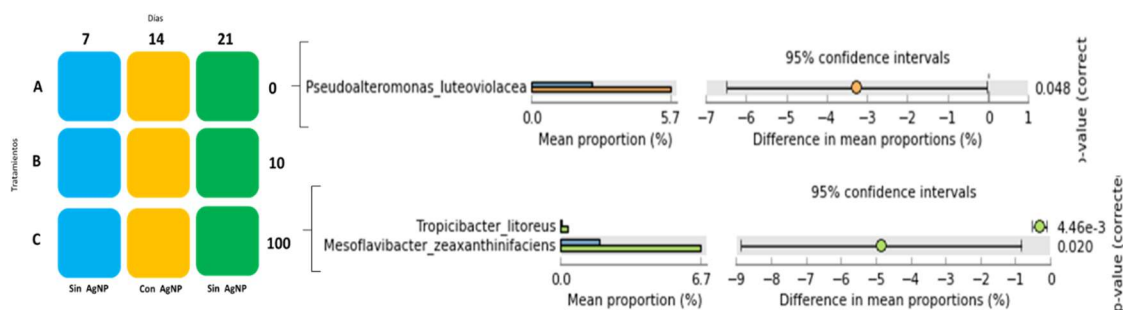


Figura 35. Comparaciones de proporciones a nivel orden por tratamiento de muestreo. a) 0 vs 10 ppm, b) 0 vs 100 ppm

8. DISCUSIÓN

8.1. Composición proximal de algas

En cuanto a la composición química de las muestras de algas marinas presentadas en la Tabla 9, *U. clathrata* fue la que presentó el mayor contenido de proteína concordando con resultados publicados por Peña-Rodríguez *et al.* 2011 (20-26%). En contraste, *C. osmundacea* y *P. californica* presentaron un contenido de proteína más bajo, sin embargo, no hubo estudios previos disponibles para comparar. El contenido de lípidos en todas las especies de algas fue bajo, como se esperaba: Estos valores coinciden con los reportados previamente para *E. arborea* (0.19%) (Landa-cansigno *et al.* 2017) y *E. menziesii* (0.14%) (Guerra-Rivas *et al.* 2011) pero no para *S. compressa*, la cual presentó un contenido mayor al (1.46%) reportado por Guerra- Rivas en 2011. Las cenizas y los carbohidratos fueron los compuestos principales en todas las algas marinas, con un rango entre 23-34(%) y 54-65(%), estos resultados coinciden con los valores reportados previamente por estos mismos autores (Guerra-Rivas *et al.* 2011; Peña-Rodríguez *et al.* 2011; Landa-cansigno *et al.* 2017).

8.2. Rendimiento y caracterización de extractos

El rendimiento de los extractos acuosos fue mayor que en los extractos hidroetanólicos. Sin embargo, los resultados obtenidos caen dentro del rango previamente reportado para extractos acuosos e hidroetanólicos para algas cafés y verdes de 28–58(%) (Imbs *et al.* 2009; Costa *et al.* 2012; Tenorio-Rodriguez *et al.* 2017). El CFT en los extractos hidroetanólicos fue mayor que en los extractos acuosos como se esperaba, esto puede ser atribuido al método de extracción ya que la aplicación de sonicación y la adición de solventes como metanol, etanol y/o acetona favorece la extracción de este tipo de compuestos (Xi *et al.* 2009). El contenido de CFT del extracto hidroetanólico *S. compressa* fue mayor que la concentración previamente reportada para la misma especie (anteriormente conocida como *Pelvetia fastigata*) extraída con metanol al 80(%) (5.2 a 6 g de PGE por 100 g de algas secas) (Van Alstyne *et al.* 1999). *C. osmundacea* presentó un TPC más alto en comparación con los extractos de metanol de *C. neglecta* y *C. osmundacea* (1.37 y 1.60 g de PGE por 100 g de algas BS) (Van Alstyne *et al.* 1999). *E.*

menziesii estuvo dentro de los valores previamente informados para los extractos de metanólicos (0,36 a 2,16 g de PGE por 100 g de algas BS) (Van Alstyne *et al.* 1999). *U. clathrata* coincidió con los valores (8-12%) previamente reportados por Cabello-Pasini *et al.* 2011 para *U. rigida*. En el caso de *P. californica*, no se encontraron estudios previos para CFT. Las diferencias en CFT entre este y los estudios previos podrían atribuirse a varios factores como: el área de recolección de algas, la estación, el método de secado, los solventes y las condiciones de extracción.

El contenido de extracción de polisacáridos fue favorecido en los extractos acuosos, excepto en el caso de *P. californica*. Estos resultados coinciden con los previamente reportados para *E. arborea* (55.30%) por Landa-cansigno *et al.* 2017, *S. compressa* (50.6%) y *E. menziesii* (28.9%) por Guerra-Rivas *et al.* 2011, *U. Clathrata* (19-24 %) por Peña-Rodríguez *et al.* 2011, *C. Osmundacea* (18-44%) por Manev *et al.* 2013 y Ammar *et al.* 2015, *M. Pyrifera* (22.3%) por Hernández-Carmona *et al.* 1998.

8.3. Síntesis de AgNPs

De acuerdo a lo descrito en literatura es la primera vez que se reporta síntesis de AgNPs con especies de algas colectadas en México; en el caso de las AgNPs sintetizadas con *Ulva clathrata* es la primera vez que se utilizan extractos de alga obtenida en un sistema de producción a gran escala, para este caso el origen del alga representa una ventaja sobre las especies colectadas del medio natural ya que su composición puede presentar una menor variación debido a los cambios estacionales y zona de colecta, además debido a que su producción es constante se puede garantizar el escalamiento para la obtención de estas AgNPs.

Las AgNPs sintetizadas coinciden con los valores de distribución reportados previamente por otros autores (Tabla 3), así como también con las moléculas responsables del poder reductor y estabilizante, las soluciones de AgNPs exhibieron un pico de absorción intenso en el espectro UV-vis debido al SPR. Según la teoría de Mie, la forma, el ancho, la altura y el número de picos SPR están fuertemente relacionados con la forma, el tamaño de partícula, la concentración y la distribución de las partículas, respectivamente (Sun and Xia 2002; Dehnavi *et al.* 2013). La ubicación y la forma del pico SPR único observado para las AgNPs demuestran la presencia de partículas esféricas menores de 100 nm, con

una distribución log-normal. Estos resultados están de acuerdo con los espectros SPR reportados por otros autores para AgNPs o AgCl NPs (Choi *et al.* 2008; Mendoza-eséndez *et al.* 2013; Dhas *et al.* 2014; Pal *et al.* 2015). Por otra parte, los extractos con alto contenido de minerales (>30%) no fueron buenos agentes reductores, en contraste, los extractos con alto contenido de polisacáridos (>20%) tuvieron un mejor efecto reductor y estabilizante.

8.4. Caracterización de AgNPs con mejor actividad antibacteriana

En el caso de la caracterización de las AgNPs sintetizadas con el extracto de *U. clathrata* las señales de los planos cristalográficos en el análisis XRD indicaron la presencia de partículas de Ag y AgCl. La formación de estas partículas podría deberse a la interacción de los iones de plata con los iones de cloruro presentes en el extracto de *Ulva*. La presencia de Na^+ , K^+ y Cl^- es típica en las macroalgas dado que son los principales iones responsables del mantenimiento de la presión osmótica interna (Lee and Liu 1999). Dhas *et al.* (2014) y Venkatesan *et al.* (2016) informaron resultados similares con respecto a la biosíntesis de AgNPs con extractos acuosos de las algas pardas *Sargassum plagiophyllum* y *Ecklonia cava*, respectivamente.

Las AgNPs sintetizadas exhibieron una morfología heterogénea, con predominio de partículas de forma esférica e irregular. Esto concuerda con los informes de varios autores de formas de partículas esféricas, irregulares y triangulares de NP sintetizadas con extractos de algas pardas y verdes (Kannan *et al.* 2013b; Yousefzadi *et al.* 2014; Sanyasi *et al.* 2016; Ramkumar *et al.* 2017a), quienes comparten que las nanopartículas cuya síntesis es mediada por extractos naturales presentan características morfológicas y microestructurales especiales y únicas, las cuales están fuertemente vinculadas a la composición del agente reductor. Uno de los aspectos más importantes a la hora de producir nanopartículas es su tamaño, dado que su actividad biológica está fuertemente asociada a su distribución de tamaños (Dehnavi *et al.* 2013). El tamaño de las AgNPs, medido por TEM concuerda con resultados de trabajos anteriores donde se reportan valores de 5 a 210 nm en NP sintetizadas con extractos de algas verdes (Devi and Bhimba 2012; Kannan *et al.* 2013a; Abirami and Kowsalya 2015; Sanyasi *et al.* 2016; Ramkumar *et al.* 2017a).

Los estudios microestructurales de SAED y EDX confirmaron que las partículas están compuestas principalmente de Ag y Cl, seguidas de C, S y O. Estas señales probablemente pueden atribuirse a proteínas adsorbidas y polisacáridos sulfatados (ulvan) procedentes de la composición del extracto. Los estudios HRTEM exhibieron dos tipos de partículas: las primeras son pequeñas, esféricas y monocristalinas compuestas solo por la fase Ag, mientras que las segundas son grandes, irregulares y policristalinas compuestas por fases Ag y AgCl. Además, se encontraron fallas de apilamiento en la morfología de partículas grandes. Esta propiedad y la forma de partícula irregular se deben a un crecimiento en el tamaño de partícula por coalescencia de partículas más pequeñas que buscan estabilizarse dentro del medio. Este fenómeno se ha informado brevemente en AgNPs sintetizados con extractos naturales (Mendoza-Reséndez *et al.* 2013, 2014)

Los análisis FTIR y Raman confirmaron la presencia de grupos funcionales de biomoléculas principalmente proteínas, polisacáridos sulfatados y polifenoles en el AEU, los cuales son adheridos en la superficie y la microestructura de las AgNPs. De acuerdo con otros autores que informaron vibraciones similares en estudios FTIR de NP sintetizados con extractos de algas verdes, estas moléculas son los principales compuestos responsables de reducir y amortiguar las nanopartículas (El-Kassas *et al.*, 2014; Ramkumar *et al.*, 2017) haciéndolas estables durante más tiempo que las mediadas químicamente (Vijayan *et al.*, 2016). Además, estos compuestos pueden aportar propiedades novedosas y únicas, así como aplicaciones potenciales para las NP correspondientes (Nezamdoost *et al.*, 2014).

8.4. Actividad antibacteriana

Los resultados de la actividad antibacteriana obtenidos en el presente estudio coinciden con lo reportado previamente por otros autores quienes han informado IZ con AgNPs o Ag coloidal en el rango de 4.0 a 16.5 mm contra *Vibrio parahaemolyticus* AHPND + (Morales-Covarrubias *et al.*, 2016; Sivaramasamy and Zhiwei, 2016; Sivaramasamy *et al.*, 2017) y de 10 a 14.27 mm contra *Vibrio harveyi* (Kandasamy *et al.*, 2012; Sivaramasamy and Zhiwei, 2016). Por otra parte, autores han reportado actividad antibacteriana de extractos de *algas pardas y verdes*, (hechos con solventes de diferentes polaridades) contra *Vibrio* y otras cepas importantes para la salud humana (Rebecca *et al.* 2012; Saritha

et al. 2013; Vatsos and Rebours 2015). Sin embargo, en nuestro caso, no se observó actividad antibacteriana en los extractos, este resultado puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las bacterias, la especie de *alga* o el método utilizado para la extracción. Sin embargo, aunque no presentaron actividad antibacteriana los compuestos extraídos presentaron una excelente actividad reductora y estabilizadora para la formación de NPs.

La concentración inhibitoria mínima (MIC) representa la concentración más baja de solución antibacteriana que inhibe el crecimiento bacteriano. En contraste, la concentración bactericida mínima (MBC) representa la concentración más baja de solución antibacteriana requerida para matar más del 99.9(%) de la población bacteriana inicial (Petrus *et al.* 2011). Los valores de MIC y MBC obtenidos para las AgNPs fueron inferiores a los reportados por Petrus *et al.*, (2011) donde se evaluó Ag coloidal contra otras cepas de *Vibrio* y reportaron un MIC de $9.64 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un MBC $>100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

8.5. Estabilidad de alimentos adicionados con AgNPs

El aumento que se observó en las concentraciones de Ag en el alimento después de la lixiviación con respecto al valor inicial puede atribuirse a la pérdida de macronutrientes solubles presentes en la dieta como proteínas (aminoácidos) y azúcares, de esta forma la pérdida de estos macronutrientes resulta en que los ingredientes menos solubles o aquellos que no se lixivian en el agua presentan una tendencia a concentrarse en el alimento después de ser sumergido en el agua. Por otro lado, las diferencias entre las concentraciones de Ag teóricas y medidas en los alimentos suplementados podrían deberse a la manipulación durante el proceso de preparación; sin embargo, estas diferencias con respecto a las concentraciones nominales fueron aceptables. Este resultado confirma que la exposición a la dieta es una forma buena y estable de administrar NP y evaluar su efecto en los camarones. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre el contenido residual en las heces de camarones y su disposición final para futuras aplicaciones en la acuicultura de camarones.

8.6. Toxicidad aguda y crónica

El consumo de alimentos suplementados a bajas concentraciones (10 y 100 ppm) tuvo un efecto positivo en la tasa de crecimiento. Este resultado coincide con los resultados de supervivencia y crecimiento reportados por Sivaramasamy y Zhiwei (2016), quienes

alimentaron camarones *L. vannamei* ($6,82 \pm 2,16$ g) con una concentración de 10 000 ppm de AgNPs sintetizados por *B. subtilis* durante 65 días. En contraste, los alimentos suplementados a altas concentraciones (1 000 y 10 000 ppm) probablemente resultaron en daño hepático moderado (no visible) como lo sugiere la reducción significativa observada en el IPH. Este efecto negativo sobre el IPH, seguido del daño histológico, se ha informado este efecto en truchas después de ocho semanas de exposición en agua con AgNPs a concentraciones de 3 300 y 1 000 mg de Ag L⁻¹ (Monfared and Soltani 2013). Sin embargo, no existen estudios similares en camarones que permitan una comparación con nuestros resultados en términos de reducción de IPH y toxicidad de AgNPs en la dieta.

8.7. Bioacumulación y depuración de AgNPs

En términos de bioacumulación y biodistribución, las concentraciones más altas de Ag fueron encontradas en el hepatopáncreas, esto debido a que la glándula del hepatopáncreas de los crustáceos es considerado un órgano blanco para la acumulación de muchos tipos de sustancias; además de realizar funciones importantes como secretar enzimas digestivas, servir como el sitio principal para la adsorción de alimentos y almacenar reservas metabólicas, este órgano también contiene vesículas con proteínas de unión a metales que le permiten secuestrar metales pesados y otros tipos de sustancias (Carvalho *et al.* 1999). En contraste, el músculo no mostró prácticamente bioacumulación, lo cual es un resultado deseable dado que representa la porción más comestible de los camarones. Sin embargo, la bioacumulación de intensidad media en la cutícula del cefalotórax sugiere que las colas de camarones con cáscara podrían contener ciertos niveles de Ag residual. En este sentido, varios estudios han encontrado que la biodistribución y la toxicidad de las nanopartículas está fuertemente influenciada por el tamaño de las partículas, la forma, la carga superficial, el recubrimiento de la superficie y la solubilidad (Sivaramasamy and Zhiwei 2016). Además, los resultados sugieren que los camarones tienen una rápida capacidad de depuración de Ag, la cual se lleva a cabo principalmente por el hepatopáncreas debido a que mostró las tasas de asimilación y depuración más altas. El valor de FMF indica cuántas veces el contenido de alimento Ag puede biomagnificarse en los compartimentos del organismo, lo que en este caso indica que el hepatopáncreas presenta una capacidad de biomagnificación de Ag de diez veces más que la administrada por exposición al alimento.

Por otra parte, se reportan tiempos de vida media de Ag de 4 a 9 días en los tejidos muestreados durante el estudio de depuración en hepatopáncreas, branquias y músculo, estos valores son más bajos que pero bastante congruentes con los reportados previamente por Metian *et al.* (2010) quienes mostraron un valor $t_{1/2}$ de 10.8 ± 2 días para la depuración de *Litopenaeus stylirostris* después de la exposición dietética a Ag⁺ radiomarcada. Dentro de este tema, autores han estudiado la bioacumulación y purificación de metales nobles y pesados, incluida la plata iónica, radiomarcada o compleja en crustáceos con el propósito de establecer el estado actual de acumulación, distribución y migración dentro de la cadena trófica de metales producto de la contaminación en el ecosistema. Sin embargo, principal de nuestro estudio no se centra en la contaminación por metales en los sistemas acuáticos, sino que tiene como objetivo proporcionar información sobre los productos antibacterianos de nueva generación fabricados con nanotecnología y promover dosis apropiadas que tengan un impacto mínimo en los sistemas biológicos.

8.8. Efecto de AgNPs sobre histología de camarón

Las dosis altas de hasta 1000 ppm ocasionaron daños histológicos significativos en el HP. En base a estos resultados se concluyó que el uso de éstas AgNPs debe restringirse a dosis entre 10 y 100 ppm. Actualmente, no han sido reportados estudios de toxicidad de AgNPs administradas vía dietaría en términos histológicos para camarón. Los estudios realizados en otros invertebrados (*Daphnia magna*) y en peces (*Danio rerio* y *Rainbow trout*) expuestos por vía acuosa en agua dulce han mostrado un amplio rango de dosis, que van desde 5 ng hasta 100 mg ml⁻¹ definidas como tóxicas las cuales a su vez son dependientes de la especie de prueba y dosis administradas (Bianchini and Wood 2002; Bilberg *et al.* 2012; Monfared and Soltani 2013; Mackevica *et al.* 2015; Yazdanparast *et al.* 2016). La diversidad en los resultados de toxicidad de AgNPs reportados para diferentes organismos es atribuido a diferentes factores ambientales (pH, salinidad), vía de exposición (agua, alimento), y características físicas que afectan su biodisponibilidad (liberación de iones, tamaño, forma, carga, recubrimiento de las NPs, solubilidad) (Scown *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012; Macken *et al.* 2012).

8.9. Protección de alimentos adicionados con AgNPs contra desafíos bacterianos Vp AHPND+

La actividad anti-*Vibrio* de las AgNPs no se pierde al adicionarlas en alimentos peletizados para camarón y su consumo a dosis bajas (menores a 100 AgNPs mg kg⁻¹ de alimento) durante 7 días aumento significativamente la sobrevivencia hasta en un 78 (%) en organismos *Litopenaeus vannamei* desafiados por baño con *Vibrio parahaemolyticus* AHPND⁺ coincidiendo con sobrevivencias reportadas por estudios previos en un rango desde un 70 hasta un 90(%) (ver referencias en Tabla 3). Por otra parte, existen hallazgos donde se concluye que la plata en forma coloidal también tiene un efecto protector contra *Vibrio parahaemolyticus* AHPND⁺, ya que Morales-Covarrubias y colaboradores en 2016 reportan una sobrevivencia del 90 (%) en organismos *L. vannamei* desafiados *Vibrio parahaemolyticus* AHPND⁺ previamente alimentados con dietas adicionadas plata coloidal comercial.

8.10. Efecto de AgNPs sobre microbiota intestinal de camarón

Aunque existen estudios en otros organismos en lo que se ha demostrado que el consumo de nanopartículas de plata puede modificar la microbiota intestinal y que esto depende del tamaño de la nanopartícula, de su forma, del revestimiento y de su composición y dosis (Qiu *et al.* 2018). Los grupos de bacterias donde hubo impacto debido al consumo de las dietas adicionadas con AgNPs, por ejemplo las bacterias del género *Vibrio* han sido reportadas previamente como bacterias gram negativas más abundantes en el intestino de especies de camarón como: *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* y *Fenneropenaeus chinensis*, dentro de este grupo de bacterias gram-negativas han sido reportadas como cepas altamente patógenas para camarón *Vibrio parahaemolyticus*, sin embargo en su mayoría son endógenas y no virulentas con roles funcionales (Wang *et al.* 2014; Cardona *et al.* 2016). El género *Photobacterium* es parte de la familia *Vibrionaceae* y contiene cuatro especies: *P. phosphoreum*, *P. leiognathi*, *P. angustum* y *P. damsela*. Esta última fue asociada a mortalidades espontánea entre camarones tigre cultivados en Taiwán y *Penaeus monodon* en India, en contraste sobre las otras tres cepas no hay ningún informe de patogenicidad en animales (Liu *et al.* 2016). Finalmente, el género *Pseudoalteromonas* son bacterias marinas gram negativas recientemente han sido reclasificadas bajo el género *Alteromonas* estas ha sido reportado como otro de los grupos de bacterias más abundantes

de la flora intestinal nativa en camarón utilizado frecuentemente como indicador de “buena salud” en organismos tanto silvestres como en maternidades (Wang *et al.* 2014; Zheng *et al.* 2017). *P. luteoviolacea* produce dos clases de compuestos antibióticos: macromoléculas polianiónicas asociadas a proteínas y compuestos bromados de bajo peso molecular (pentabromopseudilina), se ha encontrado que los iones polivalentes tienen un efecto bacteriostático al inhibir la respiración bacteriana, mientras que los compuestos bromados tienen un fuerte efecto bactericida, pero el mecanismo aún se desconoce; esta cepa produce un pigmento púrpura clasificado como violaceína, este pigmento ha mostrado una fuerte actividad antibacteriana, tumoricida, antiviral, antioxidante y anti-protozoaria (Yang *et al.* 2007).

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 7 AgNPs estables de las 14 reacciones propuestas, y en este caso los extractos acuosos fueron mejores que los extractos hidroetanólicos. De estas, las AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de *Ulva clathrata* fueron las que presentaron mejor actividad antibacteriana contra cepas de *Vibrio* (mayor potencial vs Vp AHPND), estas AgNPs presentaron una forma esférica o polimórfica, con un tamaño promedio de 9.5 nm, conformadas por fases cristalinas fcc de Ag y AgCl metálica. De acuerdo con los estudios de FTIR y Raman, las proteínas, polisacáridos y polifenoles son los responsables de la formación y estabilización de las AgNPs.

La aplicación de AgNPs producidas a partir de *Ulva clathrata* en alimentos peletizados resultó ser una forma estable de administración; y su administración a dosis adecuadas (menores a 100 ppm) resultó inocuo en términos de toxicidad, histología y bioacumulación para los organismos que las consumen. El hepatopáncreas debido a su naturaleza y fisiología presentó una tendencia a bioacumular AgNPs en mayor cantidad con respecto a cutícula, mientras que en el músculo (parte comestible) esta acumulación no fue significativa.

Los cambios en la microbiota inducidos por el uso de las AgNPs puede ser beneficioso para los camarones, pero un riesgo que también puede ocurrir es que estos cambios afecten a las comunidades microbianas con funciones importantes para estos crustáceos y el ambiente que los rodea.

El uso de AgNPs es un tratamiento efectivo contra enfermedades bacterianas en el cultivo de camarón especialmente AHPND, su aplicación puede incluso derivar en la obtención de mejores rendimientos de producción. La información generada en este trabajo de investigación respalda los buenos resultados obtenidos en experimentos realizados a nivel laboratorio en medio controlado; sin embargo, estudios futuros son necesarios ya que es críticamente importante comprender el efecto de su uso directamente en granjas de camarón enfatizando los beneficios obtenidos y desafíos, así como perspectivas a largo plazo tomando en cuenta las interacciones con el medio ambiente.

10. REFRENCIAS

- Abdel-Raouf N, Al-Enazi NM, Ibraheem IBM (2013) Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity. Arab J Chem.
- Abirami RG, Kowsalya S (2015) *Ulva fasciata* nanoparticles characterization and its anticancer activity. World J Pharm Pharm Sci 4:1164–1175
- Adamovsky O, Buerger AN, Wormington AM, et al (2018) The gut microbiome and aquatic toxicology: An emerging concept for environmental health. Environ Toxicol Chem 37:2758–2775.
- Aguirre-Guzmán G, Ruiz-Mejia H, Ascencio F (2004) A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Aquac Res 35:1395–1404.
- Alvarez-Cirerol FJ, López-Torres MA, Rodríguez-León E, et al (2019) Silver nanoparticles synthesized with rumex hymenosepalus : A strategy to combat early mortality syndrome (EMS) in a cultivated white shrimp . J Nanomater 2019:1–15.
- Ammar HH, Lajili S, Said R Ben, et al (2015) Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira*. DARU, J Pharm Sci 23:.
- AOAC, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, AOAC Internacional, Washington, DC, USA, 16th edition, 1999
- Arockiya Aarthi Rajathi F, Parthiban C, Ganesh Kumar V, Anantharaman P (2012) Biosynthesis of antibacterial gold nanoparticles using brown alga, *Stoechospermum marginatum* (kützing). Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc 99:166–173.
- ASTM (2002) Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. Ecol Res Ser EPA-600/3-75-009 96:61.
- Bell, T. A., & Lightner, D. V. (1988). A handbook of normal penaeid shrimp histology (No. 595.3843 B4)
- Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, et al (1999) Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh. J Microbiol Methods 36:215–225.
- Bianchini A, Wood CM (2002) Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna*. Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol 133:137–145.
- Bilberg K, Hovgaard MB, Besenbacher F, Baatrup E (2012) *In vivo* toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). J Toxicol 2012:9.
- Biswas N, Kapoor S, Mahal HS, Mukherjee T (2007) Adsorption of CGA on colloidal

- silver particles: DFT and SERS study. *Chem Phys Lett* 444:338–345.
- Cabello-Pasini A, Macías-Carranza V, Abdala R, et al (2011) Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J Appl Phycol* 23:363–369.
- Cardona E, Gueguen Y, Magré K, et al (2016) Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiol* 16:1–9.
- Carvalho RA, Benfield MC, Santschi PH (1999) Comparative bioaccumulation studies of colloiddally complexed and free-ionic heavy metals in juvenile brown shrimp *Penaeus aztecus* (Crustacea : Decapoda : Penaeidae). 44:403–414
- Chan Ding, Jianzhong He (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (3): 925-41.
- Chinnappan RS, Kandasamy K, Sekar A (2015) A review on marine based nanoparticles and their potential applications. *African J Biotechnol* 14:1525–1532.
- Choi O, Deng KK, Kim N, et al (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res* 42:3066–3074.
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488:178–184. doi: 10.1038/nature11319
- Conapesca (2017) Anuario estadístico de acuacultura y pesca. Comisión nacional de acuacultura y pesca, Mazatlan, Sinaloa, Mexico. pp 28
https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESPECIFICO_ESTADISTICO_2017.pdf. Access 26 Oct 2019
- Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Gallardo-Becerra L, et al (2017) Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Sci Rep* 7:1–15.
- Costa C, Alves A, Pinto PR, et al (2012) Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydr Polym* 88:537–546.
- Coutteau BP, Goossens T (2013) FEED technology functional feeds as effective strategies against EMS. *AQUA Cult. Asia Pacific Mag.* 31–33
- Cruz-Suarez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-Lopez MG, et al (2009) Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquac Nutr* 15:421–430.
- Dhas TS, Kumar VG, Karthick V, Jini AK, Govindaraju K (2014) Facile synthesis of silver chloride nanoparticles using marine alga and its antibacterial efficacy. *Spectrochim Acta A* 120:416–420

- Dehnavi AS, Raisi A, Aroujalian A (2013) Control size and stability of colloidal silver nanoparticles with antibacterial activity prepared by a green synthesis method. *Synth React Inorganic, Met Nano-Metal Chem* 43:543–551.
- Devi JS, Bhimba BV (2012) Silver nanoparticles: Antibacterial activity against wound isolates & in vitro cytotoxic activity on human caucasian colon adenocarcinoma. *Asian Pacific J Trop Dis* 2:S87–S93.
- El-Kassas, El Komi, El-Kassas H, M.M. E-K (2014) Biogenic silver nanoparticles using seaweed *Ulva rigida* and their fungicidal and cytotoxic effects. *JKAU Mar Sci* 25:3–20.
- El-Kassas HY, El-Sheekh MM (2014) Cytotoxic activity of biosynthesized gold nanoparticles with an extract of the red seaweed *Corallina officinalis* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15:4311–4317.
- El Kassas HY, Attia AA (2014) Bactericidal application and cytotoxic activity of biosynthesized silver nanoparticles with an extract of the red seaweed *Pterocladiaella capillacea* on the HepG2 cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15:1299–1306.
- FAO (2018) The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Rome
- Flegel TW, Lo CF (2013) Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)
- Ganapathy Selvam G, Sivakumar K (2015) Phycosynthesis of silver nanoparticles and photocatalytic degradation of methyl orange dye using silver (Ag) nanoparticles synthesized from *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux. *Appl Nanosci* 5:617–622.
- Geoprincy G, Saravanan P, Gandhi NN (2011) A novel approach for studying the combined antimicrobial effects of silver nanoparticles and antibiotics through agar over layer method and disk diffusion method. *J Nanomater* 6:1557–1565
- Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, Lozano R B-LM (2014) Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc* 2:e00055-14.
- Gomez-Gil B, Roque a, Guerra-Flores a L (2001) Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. *Camaronicultura y Medio Ambient* 315–346
- Govindaraju K, Kiruthiga V, Kumar VG, Singaravelu G (2009) Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a marine Alga, *Sargassum Wightii* Grevilli and Their Antibacterial Effects. *J Nanosci Nanotechnol* 9:5497–5501.
- Guerra-Rivas G, Gómez-gutiérrez CM, Ayala-sánchez NE (2011) Screening for anticoagulant activity in marine algae from the Northwest Mexican Pacific coast. 495–503.

- Han JE, Tang KFJ, Lightner D V. (2015) Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. Dis Aquat Organ 115:.
- Han X, Geller B, Moniz K, et al (2014) Monitoring the developmental impact of copper and silver nanoparticle exposure in *Drosophila* and their microbiomes. Sci Total Environ 487:822–829.
- Hernández-Carmona G, McHugh DJ, Arvizu-Higuera DL, Rodríguez-Montesinos YE (1998) Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. 1. Effect of pre-extraction treatments on yield and quality of alginate. J Appl Phycol 10:507–513.
- Imbs TI, Krasovskaya NP, Ermakova SP, et al (2009) Comparative study of chemical composition and antitumor activity of aqueous-ethanol extracts of brown algae *Laminaria cichorioides*, *Costaria costata*, and *Fucus evanescens*. Russ J Mar Biol 35:164–170.
- Irianto A, Austin B (2002) Probiotics in aquaculture. 25:333–342
- Jegadeeswaran P, Rajeshwari S, Venkatesh R (2012) Green synthesis of silver nanoparticles from extract of *Padina tetrastrum* leaf. 7:991–998
- Kandasamy K, Alikunhi NM, Manickaswami G, et al (2012) Synthesis of silver nanoparticles by coastal plant *Prosopis chilensis* (L.) and their efficacy in controlling vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. Appl Nanosci 3:65–73.
- Kannan RRR, Arumugam R, Ramya D, et al (2013a) Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalga *Chaetomorpha linum*. Appl Nanosci 3:229–233.
- Kannan RRR, Stirk WA, Van Staden J (2013b) Synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Codium capitatum* P.C. Silva (Chlorophyceae). South African J Bot 86:1–4.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams 1999–2000. A national reconnaissance. Environment Science and Technology 36:1202–1211.
- Kondo H, Van PT, Dang LT (2015) Draft Genome Sequence of Non- *Vibrio parahaemolyticus* acute diseased shrimp in Vietnam. 3:2014–2015.
- Kora AJ, Sashidhar RB, Arunachalam J (2012) Aqueous extract of gum olibanum (*Boswellia serrata*): A reductant and stabilizer for the biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles. Process Biochem 47:1516–1520.
- Krishnamoorthy S, Sudalayandi K, Masilamani D, Prasanna KP (2014) Evaluation of marine macro alga, *Ulva fasciata* against bio-luminescent causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. African J Microbiol Res 8:803–813.

- Kumar P, Govindaraju M, Senthamilselvi S, Premkumar K (2013a) Photocatalytic degradation of methyl orange dye using silver (Ag) nanoparticles synthesized from *Ulva lactuca*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 103:658–61.
- Kumar P, Selvi SS, Prabha a L, et al (2012a) Antibacterial activity and in-vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized. *Dig J Nanomater Biostructures* 7:1447–1455
- Kumar P, Selvi SS, Prabha a L, et al (2012b) Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. *Nano Biomed Eng* 4:12–16.
- Kumar P, Senthamil Selvi S, Govindaraju M (2013b) Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida* spp. *Appl Nanosci* 3:495–500.
- Kumar P, Senthamil Selvi S, Lakshmipraba A, et al (2012c) Efficacy of bio-synthesized silver nanoparticles using *Acanthophora spicifera* to encumber biofilm formation. *Dig J Nanomater Biostructures* 7:511–522
- Landa-cansigno C, Hernández-carmona G, Arvizu-Higuera DL, et al (2017) Bimonthly variation in the chemical composition and biological activity of the brown seaweed *Eisenia arborea* (Laminariales: Ochrophyta) from Bahía Magdalena , Baja California Sur , Mexico. *J Appl Phycol*.
- Lee T-M, Liu C-H (1999) Correlation of decreased calcium contents with proline accumulation in the marine green macroalga *Ulva fasciata* exposed to elevated NaCl contents in seawater. *J Exp Bot* 50:1855–1862.
- Liu F, Liu G, Li F (2016) Characterization of two pathogenic photobacterium strains isolated from *Exopalaemon carinicauda* causing mortality of shrimp. *Aquaculture* 464:129–135.
- Liu L, Xiao J, Xia X, et al (2015) Draft Genome Sequence of *Vibrio owensii* Strain SH-14 , Which Causes. 3:3354.
- Luna, L.G. (1968) Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition, McGraw-Hill, New York.
- Luna C, Chávez VH, Barriga-Castro ED, et al (2015a) Biosynthesis of silver fine particles and particles decorated with nanoparticles using the extract of *Illicium verum* (star anise) seeds. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 141:43–50.
- Luna C, Cruz-Suarez LE, Mendoza-Resendez R, Ricque-Marie D, Gonzalez-Dueñas C, Maldonado-Muñiz M (2015) Insituto meicano de la propiedad intelectual (IMPI) solicitud de patente MX/a/2015/002621 <http://sigs.impi.gob.mx/newSIGA/content/common/principal.jsf>. Access 26 Oct 2019

- Macken A, Byrne HJ, Thomas K V (2012) Effects of salinity on the toxicity of ionic silver and Ag-PVP nanoparticles to *Tisbe battagliai* and *Ceramium tenuicorne*. *Ecotoxicol Environ Saf* 86:101–10.
- Mackevica A, Skjolding LM, Gergs A, et al (2015) Chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* under different feeding conditions. *Aquat Toxicol* 161:10–16.
- Manev Z, Iliev a., Vachkova V (2013) Chemical characterization of brown seaweed - *Cystoseira barbata*. *Bulg J Agric Sci* 19:12–15
- Martínez-Porchas M, Vargas-Albores F (2017) Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Rev Aquac* 9:42–56.
- Mendoza-Reséndez R, Gómez-Treviño A, Barriga-Castro ED, et al (2014) Synthesis of antibacterial silver-based nanodisks and dendritic structures mediated by royal jelly. *RSC Adv* 4:1650–1658.
- Mendoza-Reséndez R, Núñez NO, Barriga-Castro ED, Luna C (2013) Synthesis of metallic silver nanoparticles and silver organometallic nanodisks mediated by extracts of *Capsicum annuum* var. aviculare (piquin) fruits. *RSC Adv* 3:20765–20771.
- Meneses Márquez JC, Partida AH, Mejía JC, et al (2018) Silver nanoparticles applications (AgNPS) in aquaculture. *Int J Fish Aquat Stud* 6:5–11
- Merrifield DL, Shaw BJ, Harper GM, et al (2013) Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Pollut* 174:157–163.
- Metian M, Hédouin L, Eltayeb MM, et al (2010) Metal and metalloid bioaccumulation in the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) from New Caledonia: Laboratory and field studies. *Mar Pollut Bull* 61:576–584.
- Mohandass C, Vijayaraj AS, Rajasabapathy R, et al (2013) Biosynthesis of silver nanoparticles from marine seaweed *Sargassum cinereum* and their antibacterial activity. *Indian J Pharm Sci* 75:606–10
- Monfared AL, Soltani S (2013) Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. *Pelagia Res Libr* 3:285–289
- Morales-Covarrubias MS, García-Aguilar N, Bolan-Mejía MDC, Puello-Cruz AC (2016) Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Dis Aquat Organ* 122:57–65.
- Mukherjee PK, Roy M, Mandal BP, et al (2008) Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology* 19:1–7.

- Murugan K, Benelli G, Ayyappan S, et al (2015a) Toxicity of seaweed-synthesized silver nanoparticles against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* and its impact on predation efficiency of the cyclopoid crustacean *Mesocyclops longisetus*. Parasitol Res 114:2243–2253.
- Murugan K, Samidoss CM, Panneerselvam C, et al (2015b) Seaweed-synthesized silver nanoparticles: an eco-friendly tool in the fight against *Plasmodium falciparum* and its vector *Anopheles stephensi*. Parasitol Res 114:4087–4097.
- Múzquiz AR, Tapia-Salazar M, Maldonado-Muñiz M, et al (2019) Nutraceutical Potential of Five Mexican Brown Seaweeds. Biomed Res Int 2019:1–14
- Narrowe AB, Albuthi-Lantz M, Smith EP, et al (2015) Perturbation and restoration of the fathead minnow gut microbiome after low-level triclosan exposure. Microbiome 3:1–18.
- Nezamdoost T, Bagherieh-Najjar MB, Aghdasi M (2014) Biogenic synthesis of stable bioactive silver chloride nanoparticles using *Onosma dichroantha* Boiss. root extract. Mater Lett 137:225–228.
- Nunan L, Lightner D, Pantoja C, Gomez-Jimenez S (2014) Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. Dis Aquat Organ 111:.
- OECD (2005) OCED Detailed review paper on aquatic arthropod in life cycle and two-generation toxicity tests. OECD Environment Health and Safety Publications, OECD Publishing, Paris, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/34241659.pdf>. Accessed 15 Feb 2017
- OECD (2012) Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris
- Oetama VSP, Hennersdorf P, Abdul-Aziz MA, et al (2016) Microbiome analysis and detection of pathogenic bacteria of *Penaeus monodon* from Jakarta Bay and Bali. Mar Pollut Bull 110:718–725.
- OIE (2014) Antimicrobial use in aquatic animals. In: Aquatic animal health code, Seventeenth. World organisation for animal health, Paris, pp 109–117
- Pal S, Tak YK, Song JM (2015) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. J Biol Chem 290:1712–1720.
- Peña-Rodríguez A, Mawhinney TP, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE (2011) Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. Food Chem 129:491–498.
- Pérez-Sánchez T, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Balcázar JL (2014) Probiotics in aquaculture: A current assessment. Rev Aquac 6:133–146.
- Petrus EM, Tinakumari S, Chai LC, et al (2011) A study on the minimum inhibitory

- concentration and minimum bactericidal concentration of nano colloidal silver on food-borne pathogens. *Int Food Res J* 18:55–66
- Ponnuchamy K, Jacob JA (2016) Metal nanoparticles from marine seaweeds - A review. *Nanotechnol. Rev.* 5:589–600
- Prasad TNVK V., Kambala VSR, Naidu R (2013) Phyconanotechnology: synthesis of silver nanoparticles using brown marine algae *Cystophora moniliformis* and their characterisation. *J Appl Phycol* 25:177–182.
- Qiu K, Durham PG, Anselmo AC (2018) Inorganic nanoparticles and the microbiome. *Nano Res* 11:4936–4954.
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27:76–83.
- Raja SB, Suriya J, Sekar V, Rajasekaran R (2012) Biomimetic of silver nanoparticles by *Ulva lactuca* seaweed and evaluation of its antibacterial activity. *Int J Pharm Pharm Sci* 4:3–7
- Rajesh S, Raja D (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ulva fasciata*(Delile) ethyl acetate extract and its activity against *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *J Biopestic* 13:119–128
- Rajeshkumar S, Malarkodi C, Gnanajobitha G, et al (2013) Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization. *J Nanostructure Chem* 3:44.
- Ramkumar VS, Pugazhendhi A, Gopalakrishnan K, et al (2017a) Biofabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of seaweed *Enteromorpha compressa* and its biomedical properties. *Biotechnol Reports* 14:1–7.
- Rebecca LJ, Dhanalakshmi V, Sharmila S (2012) Effect of the extract of *Ulva* sp on pathogenic microorganisms. *J Chem Pharm Res* 4:4875–4878
- Renugadevi K, Venus Aswini R (2012) Microwave irradiation assisted synthesis of silver nanoparticle using *Azadirachta indica* leaf extract as a reducing agent and invitro evaluation of its antibacterial and anticancer activity . 2:5–10
- Roni M, Murugan K, Panneerselvam C, et al (2015) Characterization and biotoxicity of *Hypnea musciformis*-synthesized silver nanoparticles as potential eco-friendly control tool against *Aedes aegypti* and *Plutella xylostella*. *Ecotoxicol Environ Saf* 121:31–38.
- Sanyasi S, Majhi RK, Kumar S, et al (2016) Polysaccharide-capped silver Nanoparticles inhibit biofilm formation and eliminate multi-drug-resistant bacteria by disrupting bacterial cytoskeleton with reduced cytotoxicity towards mammalian cells. *Sci Rep* 6:24929.
- Saraniya Devi J, Valentin Bhimba B, Magesh Peter D (2013) Production of biogenic silver

- nanoparticles using sargassum longifolium and its applications. Indian J Mar Sci 42:125–130
- Saritha K, Mani AE, Priyalaxmi M, Patterson J (2013) Antibacterial activity and biochemical constituents of seaweed *Ulva lactuca*. Glob J Pharmacol 7:276–282.
- Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods 42:321–4.
- Satish L, Santhakumari S, Gowrishankar S, et al (2017) Rapid biosynthesized AgNPs from *Gelidiella acerosa* aqueous extract mitigates quorum sensing mediated biofilm formation of *Vibrio* species—an in vitro and in vivo approach. Environ Sci Pollut Res 24:27254–27268.
- Scown TM, Santos EM, Johnston BD, et al (2010) Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. Toxicol Sci 115:521–534.
- Sears JR (2002) Keys to the benthic marine algae and seagrasses of british columbia, southeast Alaska, Washington and Oregon and north pacific seaweeds. Dept. of Botany, University of British Columbia, Vancouver :
- Shanmugam N, Rajkamal P, Cholan S, et al (2014) Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed *Sargassum wightii* and their antibacterial activity against some human pathogens. Appl Nanosci 4:881–888.
- Shanthi S, David Jayaseelan B, Velusamy P, et al (2016) Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. Microb Pathog 93:70–77.
- Singaravelu G, Arockiamary JS, Kumar VG, Govindaraju K (2007) A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. Colloids Surf B Biointerfaces 57:97–101.
- Singh M, Kalaivani R, Manikandan S, et al (2013) Facile green synthesis of variable metallic gold nanoparticle using *Padina gymnospora*, a brown marine macroalga. Appl Nanosci 3:145–151.
- Singh P, Kim YJ, Singh H, et al (2015) Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. Int J Nanomedicine 10:2567–2577.
- Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sritunyalucksana K, et al (2014) A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria
- Sivaramasamy E, Zagorsek K, Li F, Xiang J (2017) *In situ* synthesis of silver nanoparticles into TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose and their antivibriocidal activity against shrimp pathogens. Carbohydr Polym 166:329–337.
- Sivaramasamy E, Zhiwei W (2016a) Enhancement of vibriosis resistance in *Litopenaeus vannamei* by supplementation of biomastered silver nanoparticles by *Bacillus*

- subtilis*. J Nanomed Nanotechnol 07:1–10.
- Soto-Rodriguez SA (2019) Manejo Situación sanitaria en México : caso vibriosis y AHPND. In: LAQUA 2019 Mazatlan Sinaloa 8-10 noviembre
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, et al (2015) Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. Appl Environ Microbiol 81:1689–99.
- Stalin Dhas T, Ganesh Kumar V, Karthick V, et al (2014) Facile synthesis of silver chloride nanoparticles using marine alga and its antibacterial efficacy. 120:416–420.
- Stalin Dhas T, Ganesh Kumar V, Stanley Abraham L, et al (2012) *Sargassum myriocystum* mediated biosynthesis of gold nanoparticles. Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc 99:97–101.
- Sugita H, Tsunohara M, Fukumoto M, Deguchi Y (1987) Comparison of microflora between intestinal contents and fecal pellets of freshwater fishes. Nippon Suisan Gakkaishi 53:287–90.
- Sun Y, Xia Y (2002) Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. Source Sci New Ser 298:2176–2179.
- Suriya J, Bharathi Raja S, Sekar V, R. R (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora* sp. African J. Biotechnol. 11:12192–12198
- Swain P, Sasmal A, Nayak SK, et al (2014) Evaluation of selected metal nanoparticles on hatching and survival of larvae and fry of Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*). Aquac Res 47:498–511. doi: 10.1111/are.12510
- Tarnecki AM, Burgos FA, Ray CL, Arias CR (2017) Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. J Appl Microbiol 123:2–17.
- Tenorio-Rodriguez PA, Murillo-Álvarez JI, Campa-Cordova ÁI, Angulo C (2017) Antioxidant screening and phenolic content of ethanol extracts of selected Baja California Peninsula macroalgae. J Food Sci Technol 54:422–429.
- Thangaraju N, Venkatalakshmi RP, Chinnasamy A, Kannaiyan P (2012) Synthesis of silver nanoparticles and the antibacterial and anticancer activities of the crude extract of *Sargassum polycystum* C. Agardh. Nano Biomed Eng 4:89–94.
- Tran L, Nunan L, Redman RM, et al (2013) Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Organ 105:45–55.
- Van Alstyne KL, McCarthy JJ, Hustead CL, Duggins DO (1999) Geographic variation in polyphenolic levels of northeastern Pacific kelps and rockweeds. Mar Biol 133:371–379.

- Vargas-Albores F, Porchas-Cornejo MA, Martínez-Porchas M, et al (2017) Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. *Helgol Mar Res* 71:.
- Vaseeharan B, Ramasamy P, Chen JC (2010) Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNps) synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*. *Lett Appl Microbiol* 50:352–356.
- Vatsos IN, Rebours C (2015) Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture. *J Appl Phycol* 27:2017–2035.
- Venkatesan J, Kim S-K, Shim M (2016) Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using marine algae *Ecklonia cava*. *Nanomaterials* 6:1–18.
- Vijayan SR, Santhiyagu P, Ramasamy R, et al (2016) Seaweeds: A resource for marine bionanotechnology. *Enzyme Microb Technol* 95:45–57.
- Wang C zhong, Lin G rong, Yan T, et al (2014) The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fish Sci* 80:1001–1007.
- Wilding LA, Bassis CM, Walacavage K, et al (2016) Repeated dose (28-day) administration of silver nanoparticles of varied size and coating does not significantly alter the indigenous murine gut microbiome. *Nanotoxicology* 10:513–520.
- Xi J, Shen D, Zhao S, et al (2009) Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *Int J Pharm* 382:139–43.
- Yang LH, Xiong H, Lee OO, et al (2007) Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Lett Appl Microbiol* 44:625–630.
- Yang X, Gondikas AP, Marinakos SM, et al (2012) Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol* 46:1119–1127.
- Yazdanparast T, Sharifpour I, Soltani M, Esfahani HK (2016) Evaluation of Silver Retention in Different Organs of Zebrafish (*Danio Rerio*) Fed Diet Supplemented With Silver Nanoparticles. *5013:269–274*
- Yemm EW, Willis AJ (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J* 57:508–514.
- Yousefzadi M, Rahimi Z, Ghafari V (2014) The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (wulfen) J. Agardh. *Mater Lett* 137:1–4.
- Zhao G, Stevens SE (1998) Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the

susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *BioMetals* 11:27–32.

Zheng Y, Yu M, Liu J, et al (2017) Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Front Microbiol* 8:1–11.

Zhou Y, Zhang D, Peatman E, et al (2017) Effects of various levels of dietary copper supplementation with copper sulfate and copper hydroxychloride on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* performance and microbial communities. *Aquaculture* 476:94–105.

Sinaloa y Sonora, con el mayor desarrollo de camarón en cautiverio - Política - La Jornada.
Pagina web: <https://www.jornada.com.mx/ultimas/politica/2019/02/14/industria-del-camaron-fundamental-para-economia-de-mexico-2788.html>. Accessed 4 Nov 2019

ANEXO 1

Método AP4 para la detección de *Vibrio parahaemolyticus* causante de la necrosis aguda del hepatopáncreas

Bruno Gómez Gil R., Sonia Soto R., Julissa Enciso I.

CIAD, A.C. Unidad Mazatlán

Toma de muestras

Enriquecimiento

Para muestras de tejidos de camarón como el HP y el estómago, de reproductores o las heces de camarones juveniles, de post larvas y otros portadores sospechosos y de fuentes ambientales tales como sedimentos del estanque, se recomienda una etapa de enriquecimiento preliminar en TSB +2.0 (%) de NaCl incubando durante 4 horas a 30 °C con agitación. Después de esto, centrifugar para sedimentar las bacterias y desechar el sobrenadante. Realizar extracción de ADN a partir del sedimento bacteriano y usar aproximadamente 100 ng de concentración para cada prueba de PCR.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realiza con el kit Promega Wizard DNA purification kit según las recomendaciones del fabricante.

Detección por PCR de marcadores moleculares

La metodología utilizada para la detección de marcadores moleculares para *V. parahaemolyticus* toxigénico de camarones se realiza por PCR tiempo real basándose en la metodología propuestas por el grupo del Dr. T. Flegel (Flegel and Lo 2013; Sirikharin *et al.* 2014). Se adjuntan también los marcadores específicos para la especie *V. parahaemolyticus* (tlh) y los toxigénicos para humanos (tdh y trh, Bej *et al.*, 1999).

Primers

Se utilizan dos juegos de primers, uno para identificar a *V. parahaemolyticus* (tlh) y un juegos para identificar probablemente la(s) toxina responsable de producir los daños a los camarones (AP4). El stock de los primers se ajusta a una concentración de 100 mM y las alícuotas de trabajo a 10 mM

Tabla 1.A1. Primers utilizados para la amplificación de *V. parahaemolyticus* toxigénico.

Marcador	Fuente	Nombre primer	Secuencia	T (°C)	Tamaño amplicón (bp)	Melt Peak	Referencia
<i>tlh</i>	Hemolisina	tl-f tl-r	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG GCTACTTCTAGCAATTTCTCTGC	58	450	-	Bej <i>et al.</i> 1999
<i>tdh</i>	Termolisina directa	L-tdh R-tdh	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC	58	269	-	Bej <i>et al.</i> 1999
<i>trh</i>	Termolisina termoestable relacionada a TDH	trh-f trh-r	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	58	500	-	Bej <i>et al.</i> 1999
AP4	Plásmido toxina	AP4f2 AP4r2	TTGAGAATACGGGACGTGGG GTTAGTCATGTGAGCACCTTC	60	230	81 - 81.5 °C	Flegel <i>et al.</i> 2015

Controles

Se utilizan como control positivo para *tlh* la cepa tipo *V. parahaemolyticus* CAIM 320^T (Tabla 2.A1.) y para la presencia del plásmido, la cepa toxigénica M0904 y la cepa no toxigénica M0903. La cepa de *V. cholerae* CAIM 1408 es negativa para todas las reacciones.

Tabla 2.A1. Controles para PCR

Cepas	<i>tlh</i>	AP4
CAIM 1048	-	-
CAIM 320 ^T	+	-
M9-04	+	+
M9-03	+	+

PCR

Cada reacción (muestra) se realiza a 11.5 µL más 1 µL de ADN (total 12.5 µL por tubo) (Tabla 3.A1.).

Tabla 3.A1. Soluciones y cantidades utilizadas en la preparación de la mezcla maestra para PCR

Soluciones	Concentración	Concentración Final	1X (µL)
Agua p/PCR	-	-	5.44
Buffer	5X	1X	2.5
dNTPs	10 mM	0.2 mMol	0.25
Primer f	10 mM	1 mMol	1.25
Primer r	10 mM	1 mMol	1.25
Taq polimerasa	5 U/µL	0.025	0.06
ADN	50 ng/µL	2 ng/µL	1
Total			12.5

El protocolo usado en el termociclador consta de tres etapas, una etapa inicial de 95 °C durante 5 minutos, 35 ciclos a 95 °C/35 s, 58/35s y 72 °C/ 1.30 min; una etapa final de 72°C/ 10 min para los primers tlh, tdh y trh.

Electroforesis

La visualización se realiza en un gel de agarosa a una concentración de 2(%). Se pesan 1.13 g de agarosa y se diluyen en 65 mL de buffer-TAE 1X, colocándose en el microondas dando intervalos de tiempo (segundos) hasta su dilución. Posteriormente se enfría colocándose en el chorro de agua y se le agregan 0.65 µL de gel red (colorante fluorescente) sin formar burbujas y agitando suavemente. Se vierte en la charola de la cámara de electroforesis esperando aproximadamente 15 minutos hasta que solidifique el gel, se retira el peine y se coloca dentro de la cámara de electroforesis la cual contiene solución buffer TAE 1X. Como marcador de peso molecular se usa el [Kapa Express ladder](#) (Fig. 1.A1.).

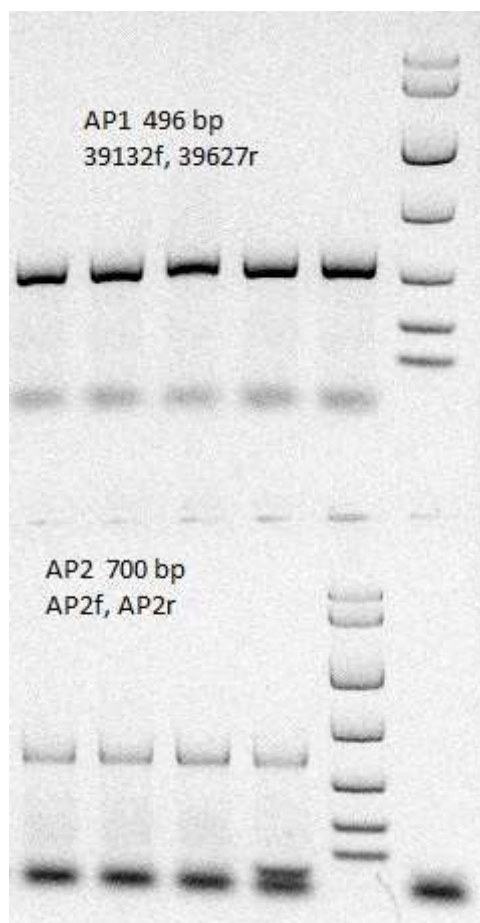


Figura 1.A1. Electroforesis de los amplicones AP1 CIAD y AP2. Marcador Kapa Express ladder.

qPCR

Cada reacción (muestra) se realiza a 4.5 μ L más 0.5 μ L de ADN (total 5 μ L por tubo) (Tabla 4.A1.).

Tabla 4.A1. Soluciones y cantidades utilizadas en la preparación de la mezcla maestra para qPCR

Soluciones	Concentración	Concentración Final	1X (μ L)
Agua p/PCR	-	-	1.88
Ssofast eva green	5X	1X	2.5
Primer f	10 mM	0.1mMol	0.1
Primer r	10 mM	0.1mMol	0.1
ADN	50 ng/ μ L	25 ng/ μ L	0.5
Total			5

El protocolo usado en el termociclador consta de dos etapas, una etapa inicial de 35 ciclos a 95 °C/15s, 60 °C/1 min y una etapa final de extensión de 65- 95 C incrementando 0.5 C cada 0:05 s.

ANEXO 2

Extracción de ADN

Después de seleccionar las muestras a analizar, la extracción de ADN se realizó siguiendo el siguiente protocolo: primero se retiró con cuidado el alcohol de las muestras para dejar solo las heces. En el caso de las dietas o el alga, se colocó 0.1g del alga o dieta en polvo en un tubo de microcentrífuga. Se agregaron 480 μ L EDTA 0,5M y 120 μ L de lisozima y se incubaron a 37°C por 30 minutos para después centrifugar 2 minutos a 14,000 rpm. Posteriormente se agregaron 350 μ L de buffer CTAB y 20 μ L de proteinasa K (20 μ g/mL) y se agitó brevemente. Después se colocó en el agitador a 55 °C toda la noche. Cuando el tejido se digirió se agregaron 300 μ L de LiCl 5M y se agitó a temperatura ambiente (TA) por un minuto. Se adicionó 5 μ L de RNAsa y se volvió a agitar a TA por otro minuto. Enseguida se agregaron 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron brevemente. Después de mezclar en el agitador a TA por 30 minutos se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos. La capa acuosa se extrajo con pipeta de 500 μ L y fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL donde se agregaron 50 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 mL de etanol al 100(%), frío. Se invirtió el tubo varias veces y se colocaron en el congelador a -20°C por una hora. Posterior a esto se centrifugó por 20 minutos a 13000 rpm a 4°C y después se removió el líquido del tubo teniendo cuidado de no perder el pellet de ADN. Al tubo se agregaron 750 μ L de etanol 70(%) y se mezclaron por 15 minutos a TA, para después centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos. Se removió el etanol con sumo cuidado y se dejó secar el pellet en campana de flujo laminar. Cuando el pellet se secó se agregaron 50 μ L de H₂O desionizada para resuspender y se almacenó a 4°C durante la noche. Finalmente se mezcló la muestra para asegurar que el pellet se disolviera totalmente.

Concentración y pureza de ADN

Para obtener la pureza de ADN se utilizó el espectrofotómetro DeNovix DS-11. Se colocó 1 μ L de la muestra en el orificio lector y se tomó registro de la relación 260/280 nm, así como la concentración.

Amplificación de la región variable V3 del gen ARNr 16S

El ADN extraído de las muestras se amplificó utilizando la técnica de PCR con primers diseñados por el Dr. Bruno Gómez-Gil para amplificar la tercera región variable V3 del gen 16S de las bacterias contenidas en cada una de las muestras. Para esto, se usaron primers forward marcados con una secuencia de nucleótidos diferente, una para cada muestra, esto para organizar las secuencias obtenidas con su muestra correspondiente. El primer reverse, era el mismo para todas las muestras.

El protocolo de PCR utilizado en la amplificación fue: desnaturalización a 95°C durante 5 min, después 40 ciclos de amplificación: 95°C/35s, 56°C/35s, y 72°C/1:30 min (unión, alineación y extensión). Se realizó una extensión final a 72°C/10 min. Todas las reacciones de amplificación de PCR se realizaron en el instrumento BIO-RAD MyCycler™ Thermal Cycler. Para la preparación de la mezcla maestra se utilizó la GoTaq® Flexi DNA Polimerasa de Promega. Las cantidades utilizadas en la preparación de la mezcla para PCR se muestran en la Tabla 1.A1.

Tabla 1.A2. Cantidades utilizadas en la preparación de la mezcla para PCR

Reactivo	Concentración	μL (3x, muestra, control positivo y negativo)
Agua MiliQ	-	44.5
Buffer	5X	15
MgCl ₂	25mM	4.5
Mix dNTP's	10mM	1.5
Primer forward	10μM	3.75
Primer reverse	10μM	3.75
TaqPolimerasa	5U/μL	0.45

La mezcla se dividió entre tres (24.5 μL) y se le añadió 0.5 μL de ADN individualmente. A la mezcla del control negativo no se le añadió ADN y para los controles positivos se les añadió ADN de la cepa CAIM 1400 (*Vibrio parahaemolyticus*). Para verificar la amplificación se corrió un gel de agarosa al 2(%) a 100V durante 45 minutos y se visualizó en un trans-iluminador Biodoc-It Imaging System.

Purificación de los productos de amplificación 16S

Una vez obtenidos los productos de PCR se realizó su purificación utilizando el kit

Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Se cortó banda y se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, se agregó 10 µL de “membrane binding solution” por cada 10 mg de gel, se dio vortex y se incubó a 55°C hasta que se disolvió por completo el gel. El gel disuelto fue transferido a la columna y se incubó por 1 min. Se centrifugó a 13,600 rpm por 1 min, y se descartó el precipitado. Se agregó 700 µL de “membrane wash solution” y se centrifugó a 13,600 rpm por 1 min, se descartó el precipitado. Al finalizar el procedimiento se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1(%) a 100 V por 45 min para verificar el resultado, al mismo tiempo que se cuantificó el ADN, utilizando el equipo Qubit® dsDNA HS Assay Kit y se realizó una mezcla equimolar de 20pM/L para cada muestra.

11.RESUMEN BIOGRÁFICO

QFB. Maribel Maldonado Muñiz

Candidato para el grado de

Doctor en ciencias con acentuación en nutrición y tecnología de alimentos para organismos acuáticos

Tesis: BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON EXTRACTOS DE MACROALGAS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN CONTRA *Vibrio parahaemolyticus* CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND/ EMS) EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.

Campo de Estudio: Nutrición y tecnología de alimentos para camarón.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, México el 4 de octubre de 1989.
Hija de Serafin Maldonado Mendoza y María Muñiz Sánchez.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en Julio 2011.

Experiencia Profesional: Responsable laboratorio de análisis de Programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Trabajos derivados de tesis doctoral:

Publicaciones Indexadas (1)

- Maldonado-Muñiz M, Carlos Luna, Mendoza-Reséndez R, Barriga-Castro ED, Soto-Rodríguez S, Ricque-Marie D, Cruz-Suarez LE. *Silver nanoparticles against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp and their depuration kinetics*. Journal of Applied Phycology. doi: 10.1007/s10811-019-01948-w.

Solicitud de patente (1)

- Luna C, Cruz-Suarez LE, Mendoza-Reséndez R, Ricque-Marie D, Gonzalez-Dueñas C, Maldonado-Muñiz M (2015). “*Método de preparación de coloides estables de nanopartículas ultrafinas de plata y partículas policristalinas de Ag/AgCl utilizando extracto de algas del género Ulva*”. Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI) Solicitud de Patente MX/a/2015/002621 <https://siga.impi.gob.mx/newSIGA/content/common/principal.jsf>.

Capítulo de libro (1)

- Maldonado-Muñiz M., Nieto-Lopez, M., Cruz-Suarez L.E. “*Nanopartículas de plata como aditivo en alimentos para control de enfermedades causadas por Vibrio en L. Vannamei*”. Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.168-199. ISBN: 978-607-27-1268-3.

Congresos nacionales e internacionales (5)

- Maldonado-Muñiz, M., González-Colunga, D., Meléndez Villanueva, M., Ríos Sánchez, Z., Soto-Rodríguez, S., Gómez-Gil, B., Ricque-Marie, D. y L.E. Cruz-Suárez. 2015. “*Nanopartículas metálicas una alternativa contra Vibrio parahaemolyticus causante de AHPND en camarón blanco Litopenaeus vannamei*”. XIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola 11-13 de noviembre 2015. Hermosillo, Sonora. Poster.
- Maldonado-Muñiz, M., Martínez-Cruz, M., Pérez-Martínez, G., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E. “*Evaluación de nanopartículas contra Vibrio parahaemolyticus causante de AHPND y su toxicidad en Artemia salina*”. XIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola 11-13 de noviembre 2015. Hermosillo Sonora. Poster.

- Maldonado-Muñiz M., Luna-Criado C., Mendoza- Reséndez R., Soto-Rodriguez S., Ricque-Marie D., Cruz-Suarez L.E. “*A green nanotechnology approach to manage the acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in cultivated shrimp*” presentación en el 6th Congress of the International Society for Applied Phycology, 18- 23 junio del 2017, Nantes, Francia (ISAP 2017). Poster.
- Maldonado-Muñiz M., Nieto-López M., Tapia-Salazar M., Ricque-Marie D., Soto-Rodríguez S., Lozano-Olvera R., Cruz-Suárez L.E. “*Evaluación toxicológica de alimentos peletizados para camarón adicionados con nanopartículas en L. vannamei*” presentación en el XIV Simposio Internacional de Nutrición Acuícola (SINA 2017), 3-5 octubre del 2017, Ensenada, BC. Poster.
- Maldonado-Muñiz M., Luna-Criado C., Mendoza- Reséndez R., Soto-Rodríguez S., Ricque-Marie D., Cruz-Suarez L.E. “*Ulva clathrata silver nanoparticles a potential approach to manage bacterial diseases in shrimp: toxicity, bioaccumulation and depuration*”. International Seaweed Symposium (ISS 2019), 28 de abril al 3 de mayo del 2019, Jeju, Korea. Poster.

Presentaciones orales (2)

- Maldonado-Muñiz M., Luna-Criado C., Mendoza-Reséndez R., Barriga-Castro E., Soto-Rodríguez S., Ricque-Marie D., Cruz-Suarez L.E. “*Ulva clathrata silver nanoparticles, a potential approach to manage acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp: toxicity, bioaccumulation and depuration*” Ciclo de Indo-Mexican conferencias "Developments in Aquaculture, Nutrition and Disease Management", 9-10 de agosto del 2019, Pondicherry University, Puducherry, India.
- Maldonado-Muñiz M., Nieto-Lopez, M., Cruz-Suarez L.E. “*Nanopartículas de plata como aditivo en alimentos para control de enfermedades causadas por*

Vibrio en L. Vannamei". XV Simposio Internacional de Nutrición Acuícola (SINA 2019), 13-15 noviembre del 2019, Mérida, Yucatán.

Premios y distinciones (4)

- Premio a la invención UANL 2014. Luna, C; Cruz-Suarez, L; Mendoza-Resendez, R; Ricque-Marie, D; Gonzalez-Dueñas, C; Maldonado-Muñiz M. "*Método de preparación de coloides estables de nanopartículas ultrafinas de plata y partículas policristalinas de Ag/AgCl utilizando extracto de algas del género Ulva*". Registro de patente: IMPI MX/a/2015/00262.
- Primer lugar en la presentación del poster nivel licenciatura en XIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola 11-13 de noviembre 2015. Hermosillo Sonora. "*Evaluación de nanopartículas contra Vibrio parahaemolyticus causante de AHPND y su toxicidad en Artemia salina*". Maldonado-Muñiz, M., Martínez-Cruz, M., Pérez-Martínez, G., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E.
- Segundo lugar en la presentación del poster nivel posgrado en XIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola 11-13 de noviembre 2015. Hermosillo Sonora. "*Nanopartículas metálicas una alternativa contra Vibrio parahaemolyticus causante de AHPND en camarón blanco Litopenaeus vannamei*". Maldonado-Muñiz, M., González-Colunga, D., Meléndez Villanueva, M., Ríos Sánchez, Z., Soto-Rodríguez, S., Gómez-Gil, B., Ricque-Marie, D. y L.E. Cruz-Suárez. 2015.
- Primer lugar en la presentación del poster nivel posgrado en el XIV Simposio Internacional de Nutrición Acuícola (SINA 2017), 3-5 octubre del 2017. Ensenada, BC. "*Evaluación toxicológica de alimentos peletizados para camarón adicionados con nanopartículas en L. vannamei*". Maldonado-Muñiz M., Nieto-López M., Tapia-Salazar M., Ricque-Marie D., Soto-Rodríguez S., Lozano-Olvera R., Cruz-Suárez L.E.

Colaboración en proyectos (3)

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto ciencia básica #2014-238458. “*Evaluación multidisciplinaria del potencial nutraceutico de macroalgas en camarones y murinos y su repercusión en el manejo de enfermedades bacterianas y metabólicas*”. Responsable del proyecto: Dra. Cruz-Suárez, L.E.
- Department of Science and Technology, Government of India, New Delhi and CONACYT, Mexico “*Development of anti-infective molecules from marine bacteria to target virulence cascade and biofilm of pathogenic vibrios*”. Responsable del proyecto: Dra. Cruz-Suárez, L.E y Dr. Joseph Selvin
- Programa de apoyo a la investigación científica y tecnológica (PAICYT) 2019, “*Síntesis de nanopartículas de plata mediada por Ulva clathrata, un posible enfoque para controlar las enfermedades bacterianas en cultivo de camarón: toxicidad, bioacumulación y depuración*”. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Clave del proyecto: CT735-19. Responsable del proyecto: Dra. Martha G. Nieto-López.

Tesis derivadas (3)

- Mayra Alejandra Meléndez Villanueva (tesis licenciatura QBP). Título de tesis: *Evaluación de la actividad antibacteriana de compuestos fitogénicos sobre cepas bacterianas aisladas de hepatopáncreas de camarones diagnosticados con mortalidades atípicas tipo EMS.*
- Zulema Sarahí Sánchez Ríos (licenciatura QBP). Título de tesis: *Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y extractos de Ulva clathrata y Orégano contra cepas de Vibrio parahaemolyticus causantes de la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en camarones Litopenaeus vannamei.*

- Yololtli Gabriela Pérez Martínez (Tesis licenciatura QBP). Título de tesis: *Evaluación del uso de nanopartículas de plata sintetizadas a base de extracto de alga Ulva clathrata en el control de la enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en camarón Litopenaeus vannamei*.

Coautor de otras publicaciones indexadas:

- Tapia-Salazar, M., Arévalo-Rivera, I. G., Maldonado-Muñiz, M., Garcia-Amézquita, L. E., Nieto-López, M. G., Ricque-Marie, D., ... & Welte-Chanes, J. (2019). The dietary fiber profile, total polyphenol content, functionality of *Silvetia compressa* and *Ecklonia arborea*, and modifications induced by high hydrostatic pressure treatments. *Food and Bioprocess Technology*, 12(3), 512-523. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2229-8>.
- Múzquiz de la Garza, A. R., Tapia-Salazar, M., Maldonado-Muñiz, M., de la Rosa-Millán, J., Gutiérrez-Urbe, J. A., Santos-Zea, L., ... & Cruz-Suárez, L. E. (2019). Nutraceutical Potential of Five Mexican Brown Seaweeds. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3795160>.
- García-Pérez, O. D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G., Cruz-Valdez, J. C., Maldonado-Muñiz, M., Guerrero Guerrero, L. M., ... & Marroquín-Cardona, A. G. (2019). Effects of conjugated linoleic acid and curcumin on growth performance and oxidative stress enzymes in juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feed with aflatoxins. *Aquaculture Research*. <https://doi.org/10.1111/are.14451>.
- Julian Gamboa, Martha Nieto, Maribel Maldonado, David Villarreal, Mireya Tapia-Salazar, Lucía Elizabeth Cruz-Suárez. Comparing the assimilation of dietary nitrogen supplied by animal-, plant- and microbial-derived ingredients in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a stable isotope study (2020). *Aquaculture Reports*. Aceptado.



Silver nanoparticles against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp and their depuration kinetics

Maribel Maldonado-Muñiz¹ · Carlos Luna² · Raquel Mendoza-Reséndez² · Enrique Díaz Barriga-Castro³ · Sonia Soto-Rodriguez⁴ · Denis Ricque-Marie¹ · Lucia Elizabeth Cruz-Suarez¹

Received: 9 July 2019 / Revised and accepted: 9 October 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Ag-based nanoparticles (NPs) were successfully produced through green synthesis using an aqueous extract from the cultivated seaweed *Ulva clathrata* as the reducing and stabilizing agent. The biosynthesized NPs had spherical to polymorphic shapes with an average size of 9.5 nm. Microstructural and compositional studies revealed that these particles contained face-centred cubic crystallites of metallic Ag and AgCl. Characteristic peaks in the Fourier-transform infrared spectrum (FTIR) and Raman studies revealed the presence of functional bioactive metabolites from the seaweed extract, such as proteins, polysaccharides, and polyphenols, which are responsible for forming and stabilizing Ag/AgCl NPs. The biosynthesized Ag/AgCl NPs exhibited an important in vitro antibacterial effect against three *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed shrimp affected with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in northwestern Mexico. *Litopenaeus vannamei* shrimp were exposed for 7 days to feeds supplemented with Ag/AgCl NPs at 10, 100, 1000, or 10,000 ppm (Ag nominal dietary concentrations). Dietary NP supplement did not affect shrimp survival, growth, or feed conversion ratio, but high concentrations (1000 and 10,000 ppm) decreased the hepatosomatic index significantly. The short-term consumption of Ag/AgCl NPs produced a significant dose-dependent bioaccumulation of Ag in the hepatopancreas and to a lesser extent in the cuticle, while bioaccumulation in the muscle was not significant. The depuration study confirmed a fast Ag assimilation in shrimp's hepatopancreas and showed a fast depuration rate in the hepatopancreas as well.

Keywords Antibacterial activity · Green seaweed · Green synthesis · *Litopenaeus vannamei* · *Vibrio parahaemolyticus*

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10811-019-01948-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Lucia Elizabeth Cruz-Suarez
lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

¹ Facultad de Ciencias Biologicas (FCB), Universidad Autonoma de Nuevo Leon (UANL), Av. Universidad S/N, 66455 San Nicolás de los Garza, Nuevo Leon, Mexico

² Facultad de Ciencias Fisico Matematicas (FCFM), Universidad Autonoma de Nuevo Leon (UANL), Av. Universidad S/N, 66455 San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico

³ Centro de Investigacion en Quimica Aplicada (CIQA), Blvd. Enrique Reyna Hermosillo, No. 140, 25294 Saltillo, Coahuila, Mexico

⁴ Centro de Investigación Alimentación y Desarrollo, Av. Sabalo-Cerritos s/n, Estero del Yugo, 82000 Mazatlan, Sinaloa, Mexico

Introduction

Shrimp farming is one of the most important aquaculture economic activities in the world, and this activity generates important economic benefits. Mexico is one of the main exporters to important international markets such as USA, Vietnam and France (Conapesca 2017). Newly emerged penaeid shrimp diseases caused by opportunistic pathogens such as *Vibrio* are producing economic losses in Mexico and worldwide (Aguirre-Guzmán et al. 2004). In 2009, the first cases of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), previously referred to as early mortality syndrome (EMS), appeared in China, Vietnam, Thailand and Malaysia. Since 2013, high mortalities (40 to 100% in the first 35 days of shrimp farming) caused by AHPND have been also reported in Mexico and Central American countries. This disease is caused by certain pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus* and is characterized by a severe atrophy of the shrimp's hepatopancreas (HP) (Joshi et al. 2014; Yang

et al. 2014; Soto-Rodriguez et al. 2015). To address these issues, several antimicrobial agents were assayed. However, these failed to completely satisfy aquaculture needs as *Vibrio* species developed resistance to some of these treatments (Sirvakumar et al. 2014; OIE 2014). The use of antibiotics to control *Vibrio* strains in shrimp aquaculture is not allowed in most of the countries (Defoirdt et al. 2011). Therefore, it is necessary to develop alternative methods for the effective control of *Vibrio* strains in shrimp production. In the face of this problem, silver nanoparticles (AgNPs) are a promising alternative because of their unique chemical and antimicrobial properties (Rai et al. 2009; Swain et al. 2014; Singh et al. 2015; Sivaramasamy and Zhiwei 2016).

Different varieties of microorganisms and plant extracts have been used in the last years for the production of metallic nanoparticles with low or no toxicity. These procedures have been called 'green synthesis' or 'green chemistry' (Dehnavi et al. 2013). Green synthesis provides advantages over physical methods and conventional chemical synthesis of nanomaterials because it produces NPs with inexpensive and energy-efficient processes that have little to no impact on the environment and human health. In addition, these processes can be easily scalable and also do not require the use of high pressure, energy, temperature, or toxic chemicals (Abdel-Raouf et al. 2017).

Seaweeds are commercially-important, renewable, marine living resources (Kumar et al. 2012) with biologically-active compounds that have activities against pathogens such as viruses, bacteria and fungi (Ibañez et al. 2012). Scientists have researched the green synthesis of gold and silver nanoparticles using several seaweed species and obtained nanoparticles with sizes averaging from 5 to 200 nm, a high synthesis rate, and an excellent colloidal stability. The phytochemicals present in seaweed extracts such as carbohydrates, peptides, alkaloids, steroids, phenolics, saponins and flavonoids are responsible for the reduction and stabilization of nanoparticles (Rai et al. 2009; Prasad et al. 2013; Swain et al. 2014; Singh et al. 2015; Sivaramasamy and Zhiwei 2016; Vieira et al. 2016).

Ulva clathrata (Roth) C. Agardh is a green alga from the Ulvaceae family with a worldwide distribution, and it can be also produced by aquaculture. This seaweed has several applications in shrimp farming as a functional feed additive or as fresh food in co-culture with white shrimp *Litopenaeus vannamei*, allowing healthier shrimp and improved water quality (Cruz-Suarez et al. 2010, 2013; Laramore et al. 2018; Peña-Rodríguez et al. 2010). Cultivated *U.* could be a promising source of reduction agents for the synthesis of nanoparticles, which production would be then easily scalable.

Although two recent reports evidenced the efficacy of AgNPs in vivo (Morales-Covarrubias et al. 2016) and in vitro against AHPND-causing *V. parahaemolyticus* (Sivaramasamy et al. 2017), none had been synthesized with

seaweed extracts. Considering these antecedents, the aim of this study was to purify and characterize Ag-based NPs produced through green chemistry using an aqueous extract of cultivated *U. clathrata* (AEU), and to evaluate their in vitro antibacterial activity against three *V. parahaemolyticus* strains obtained from farmed shrimp affected with AHPND in north-western Mexico. In addition, this project sought to examine, through short-term dietary exposure experiments, the effects of Ag-based NPs on shrimp survival and growth, as well as the Ag bioaccumulation-distribution in different tissues along with its depuration kinetics.

Materials and methods

Chemical reagents Water sterile-filtered (W3500), silver nitrate (209139), resazurine sodium salt (R7017), and sodium chloride (V000106) were from Sigma-Aldrich (USA). The bacteriological mediums Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), Mueller Hinton Agar (MHA), Mueller Hinton Broth (MHB) and Agar Agar (AA) were obtained from Difco (USA).

Seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh was cultivated on a large-scale system in a shrimp earthen pond in Sinaloa, Mexico. Details of production and processing conditions are reported by Peña-Rodríguez et al. (2011).

Bacterial strains *Vibrio parahaemolyticus* strains were obtained from laboratory culture collections at CIAD Mazatlan, Sinaloa, Mexico. Samples were isolated from the stomach and hepatopancreas of farmed shrimp affected with AHPND in northwestern Mexico. The molecular identification, characterization and pathogenicity of the bacterial isolates used in this work were reported by Soto-Rodriguez et al. (2015); *V. parahaemolyticus* strains M9-04 and M6-05 are classified as pathogenic, and M5-28 as non-pathogenic. Strains were maintained in cryopreservation (-80°C) until activated in TSB supplemented with 2% NaCl.

Preparation of aqueous extract of *Ulva* (AEU) Ten gram of seaweed powder was extracted with 200 mL of distilled hot water (90°C) stirred constantly for 15 min and left to stand in darkness for 12 h before centrifugation (2500 rpm) for 15 min (IEC Centra MP4R, International equipment company, USA). The pellet was washed twice with 100 mL hot water at 90°C . The soluble extracts were pooled and frozen at -80°C (ULT 1386-3-A14, Revco Scientific Inc., USA) for subsequent freeze-drying (Freezone Benchtop 6L, Labconco, USA).

Synthesis of NPs NPs were obtained through green synthesis with our patented method (Luna et al. 2015a, 2015b) by adding 100 mL AgNO_3 (1×10^{-3} M) aqueous solution to a

flask containing 170 mg AEU previously dissolved in 100 mL Sigma sterile-filtered water. The mixture was kept in constant magnetic stirring at room temperature for 48 h. The formation of NPs was confirmed by solution colour change. NPs were washed three times using absolute ethanol (ratio 1:3) as an antisolvent for precipitation assistance and centrifuged (10,000 rpm). Finally, the purified precipitate was re-dispersed using ultrasound (Ultrasonic cleaner 50HT, VWR International, USA) in Sigma sterile-filtered water for further characterization studies. Ag concentration was measured by atomic absorption spectroscopy (AAS) (ICE AAS 3500, ThermoScientific, UK) according to the AOAC method 990.08 (AOAC 1997) and was expressed in $\mu\text{g Ag mL}^{-1}$.

Characterization of NPs NPs presence in the brown purified colloidal sample were confirmed through UV-vis spectroscopy (Nicolet 60S, ThermoFisher Scientific, USA) analysis in the wavelength range of 300–1100 nm. Surface plasmon resonance (SPR) was observed for AgNPs. AEU without the addition of AgNO_3 solution was also analysed.

Crystal phases present in the sample were identified by powder X-ray diffraction (XRD) studies (X'Pert PRO diffractometer, Panalytical, USA) with $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) radiation. In this study, purified colloidal samples were dried at 50°C overnight, obtaining dried samples in powder form. Values of the mean coherence length perpendicular to the crystallographic planes (200) of AgCl and (111) of metallic Ag, $L_{200,\text{AgCl}}$ and $L_{111,\text{Ag}}$, were estimated using the Scherrer equation (Luna et al. 2015a, 2015b)

$$L_{\text{hkl}} = \frac{0.9 \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

where λ is the X-ray wavelength, β is the broadening of the diffraction peak (after subtracting the instrumental broadening), and θ is the Bragg angle.

Particle morphology and size distributions of the biosynthesized samples were examined with transmission electron microscopy (TEM) using a microscope (TITAN 80–300 kV, FEI, USA) operated at 300 kV. To obtain more detailed information about the microstructural properties of the samples, high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) and selected-area electron diffraction (SAED) analyses were also carried out. Moreover, energy-dispersive spectrometry (EDX) measurements were performed with an EDS analyser attached to the TEM. For these studies, the colloidal sample was properly diluted with water and a drop was deposited onto a lacey-carbon copper grid and allowed to dry in ambient conditions in a free-powder area. No evidence of structural or chemical transformations of the samples was present during the TEM examination. Processing of TEM micrographs and analysis of HRTEM images by fast Fourier

transforms (FFT) was carried out using the software Digital Micrograph 3.7.0 (Gatan Inc., USA).

FTIR and Raman studies were performed to identify the functional groups of the AEU responsible for the reduction of Ag^+ ions to Ag^0 , and their stabilizing action on Ag-based nanoparticles. FTIR spectra (Nicolet 510 Fourier transform spectrometer, ThermoFisher Scientific, USA) were collected after diluting the specimen in KBr pellets in the wavenumber range of $500\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$. Raman spectra (HR800 UV Confocal Raman Microscope, Horiba Scientific, USA) were recorded across the range of $500\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ using a green laser (532.14 nm), working at 600 line mm^{-1} , $\times 100$ objective, 20 mW , and 0.1-mm pinhole.

Antibacterial activity in vitro tests

Disc diffusion assay was performed on Mueller Hinton agar (MHA) plates plus 2% NaCl spread with $100 \mu\text{L}$ of each *V. parahaemolyticus* bacterial suspension ($1 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$). Under aseptic conditions, filter paper discs (6 mm) were saturated with $20 \mu\text{L}$ of each stock solution test from AEU ($50 \mu\text{g dry extract mL}^{-1}$), Ag/AgCl NPs, AgNO_3 solution ($50 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$) or distilled water (negative control), and were placed on MHA plates. The final concentration was $1 \mu\text{g disc}^{-1}$. After 24 h of incubation at 29°C , the inhibition zone (IZ) was measured with a digital Vernier (CD-6"CS, Mitutoyo Corp., Japan), and the IZ values were recorded as the average (mm) of two diameter measurements per disc taken in perpendicular directions. Triplicates of the assay were performed for each strain.

Microdilution broth assays were carried out according to Sarker et al. (2007) with certain modifications. Different concentrations ($100, 50, 25, 12.5, 10, 8$ and $6 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$) of Ag/AgCl NPs and AgNO_3 solution were prepared, and each one was added to four wells of sterile polystyrene 96-well microtiter plates (3370 Costar, USA). Additionally, $100 \mu\text{L}$ of Mueller Hinton broth (MHB) with 2% NaCl and $50 \mu\text{L}$ of each bacterial strain suspension ($1 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$) were added to each well. Pure MHB with 2% NaCl, sterile water and bacterial suspension were used as a negative control, while sample blanks were the evaluated treatments and media without bacteria. After incubation at 29°C for 20 h, $10 \mu\text{L}$ of 0.1% aqueous solution resazurine sodium salt were added and samples were incubated for four additional hours at the same temperature. Colour change was then assessed visually. Any colour changes from purple to pink or colourless were recorded as positive bacterial growth. The lowest concentration that produces a colour change was taken as the MIC value (Zhao and Stevens 1998). The lowest concentration at which no colour change occurred was registered to the MBC. Triplicates of the assay were performed for each strain.

Short-term evaluation in vivo tests Two different experiments were conducted to examine effects in survival and growth performance, tissue bioaccumulation-distribution and depuration of the Ag/AgCl NPs by short-term dietary exposure in shrimp. The experiments were performed according to OECD recommendations for acute toxicity in aquatic arthropods (OECD 2005) and dietary exposure bioaccumulation-distribution in fish (OECD 2012).

Supplemented feed preparation A commercial pelleted feed with 44% protein and 8% lipid contents (742 UANL, Nutrimar, Sinaloa, Mexico) was supplemented by aspersión with Ag/AgCl NPs stock solution in order to obtain Ag concentrations of 0, 10, 100, 1000 and 10,000 mg Ag kg⁻¹. Different Ag/AgCl NP stock solutions were diluted or concentrated in the same final volume of distilled water (40 mL) and sprayed on 100 g of feed previously weighed and placed in aluminium trays. Diets were mixed for 5 min to ensure complete homogenization. Finally, the feed was oven-dried at 50 °C for 1 h. The final Ag concentration in Ag/AgCl NP-supplemented feeds was quantified by AAS as described above.

Estimation of NP losses from diets The percentage of Ag/AgCl NPs lost from diets through leaching in seawater was estimated as described by Nieto-López et al. (2011) with certain modifications, including a correction in the % dry matter loss expression (%DML) for the marine salt absorbed by the immersed diets for 1 h in seawater (35 g L⁻¹, 28 °C). Ag content in leaching diets and in the water of each sample was determined by AAS and expressed as mg Ag kg⁻¹ dry matter or mg Ag L⁻¹ water.

Short-term acute toxicity and tissue distribution in vivo test

The first in vivo test evaluated acute toxicity using behavioural, survival and growth performance parameters, and analysed tissue distribution of Ag/AgCl NPs after 7 days of feed consumption with low (0, 10 and 100 mg Ag kg⁻¹) and high (1000, 10,000 mg Ag kg⁻¹) dietary levels. During the experiment, 150 juvenile shrimp [*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) provided by FITMAR, Sinaloa, Mexico (0.400 ± 0.02 g mean initial weight)] were randomly allocated in 15 rectangular fibreglass tanks of 10 L (10 shrimps per tank, five treatments and three replicates). Experimental tanks had constant individual aeration and were maintained daily with 100% manual exchange of artificial seawater (Pro Aquatics, Fritz Industrial Inc., Mesquite TX, USA) and natural conditions of photoperiod. Water temperature, salinity and pH, ammonia, nitrite, and dissolved oxygen contents were monitored daily and maintained under favourable limits for shrimp growth. The daily feed ration was 5% of total biomass per tank.

Acute toxicity parameters After 7 days of feeding shrimp with the different treatments, their behavioural effects were registered. Zootechnical parameters such as survival (%), weight gain (%) and feed conversion ratio (FCR) were calculated according to Cruz-Suarez et al. (2009).

Tissue sampling for acute toxicity test The hepatopancreas, cephalothorax cuticle and muscle from ten shrimps per treatment were dissected with tweezers before the beginning and at the end of the dietary exposure. The hepatopancreas for each shrimp was weighed individually, and the hepatosomatic index was determined using the formula shown in Eq. 2. The dissected shrimp samples of each tank were pooled and placed in pre-weighed and labeled Eppendorf tubes. Finally, all samples were oven-dried at 60 °C for 24 h and stored in a freezer at -20 °C until Ag content analysis was performed by AAS. Results obtained were expressed in mg Ag kg⁻¹ dry weight.

$$\text{HPI} = \frac{\text{HP weight}}{\text{final shrimp weight}} \cdot 100 \quad (2)$$

Depuration in vivo test The second in vivo test was conducted to evaluate Ag/AgCl NP depuration using feeds supplemented at 0 and 100 mg Ag kg⁻¹ nominal concentrations. The protocol was designed according to OECD recommendations which set uptake and depuration phases (OECD 2012; Connolly et al. 2016). *Litopenaeus vannamei* juvenile shrimp provided by FITMAR, Sinaloa, Mexico (1.9 ± 0.20 g mean initial weight) were randomly allocated in nine rectangular 10-L fibreglass tanks (19 shrimps per tank, two treatments and three replicates). Organisms were maintained in the same conditions as the first test. During the uptake phase (first 7 days), the organisms were fed the low-dose experimental diet, while the depuration phase (next 14 days) started on day 8 of the assay by switching to a diet without NPs supplement (0 mg Ag kg⁻¹). The experiment duration was 21 days.

Tissue sampling for depuration test The hepatopancreas, gills and muscle tissue from three shrimps per tank were randomly selected and dissected with tweezers at 0, 7, 16 years and 21 days of the assay. Dissected samples were pooled and placed in pre-weighed and labeled Eppendorf tubes. Finally, all the samples were oven-dried at 60 °C for 24 h and stored in a freezer at -20 °C until Ag content analysis was performed by AAS. Results obtained were expressed in mg Ag kg⁻¹ dry weight.

Depuration parameters Depuration rate and assimilation efficiency were determined based on a simple two-compartment model. To calculate the depuration rate (k_2), a linear regression of ln(concentration) versus time was performed. The slope of the regression line is an estimate of k_2 . The chemical

assimilation efficiency (%) (α , absorption of test substance across the gut) was calculated with the formula in Eq. 3:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I_g \cdot C_{\text{food}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad (3)$$

where $C_{0,d}$ is the measured concentration in shrimp at time zero of the depuration phase (mg Ag kg⁻¹ of shrimp), k_2 is the overall (not growth-corrected) depuration rate constant (day⁻¹), C_{food} is the measured concentration in food (mg Ag kg⁻¹ feed), t is the duration of the feeding period (day), and I_g is the food ingestion rate constant adjusted for shrimp growth (g feed × shrimp⁻¹ × day⁻¹). During the uptake phase, I_g can be calculated as shown in Eq. 4:

$$I_g = \frac{I \cdot W_0}{W_{\text{end of uptake}}} \quad (4)$$

where I is the gram feed per gram shrimp per day, W_0 is the mean shrimp weight at the start of the experiment, and $W_{\text{end of uptake}}$ is the mean weight on the last day of exposure.

Once the assimilation efficiency (α) is obtained, the biomagnification factor (BMF) can be calculated by multiplying α by the ingestion rate constant (I_g) and dividing by the (overall) depuration rate constant (k_2). Estimation of the time (day) needed to reach the 50% depuration ($t_{1/2}$) of Ag/AgCl NPs was estimated using Eq. 5.

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_2} \quad (5)$$

Statistical analyses Two-way ANOVA was used to analyse the significance on in vitro (diffusion disc assay), and one-way ANOVAs were used for in vivo assays (growth performance parameters, and final concentration of Ag in each tissue after 7 days of consumption), followed by Tukey post hoc tests. A Dunnett post hoc test was used for the hepatosomatic index data ($p < 0.05$). All analyses were carried out using Statistica 8.0 (TIBCO Software, USA).

Results

NP synthesis and characterization Reduction of Ag⁺ to Ag⁰ in the sample was confirmed through a colour change from the initial colourless AgNO₃ solution to reddish-brown after reacting with AEU (Fig. 1a, b). The ultraviolet-visible (UV-vis) absorbance spectrum for a purified Ag/AgCl NPs suspension presents a surface plasmon of resonance (SPR) peak centred at 435 nm; meanwhile, no peak was observed in the AEU spectrum (Fig. 1c). The final Ag concentration in the purified Ag/AgCl NPs solution was 535 µg Ag mL⁻¹.

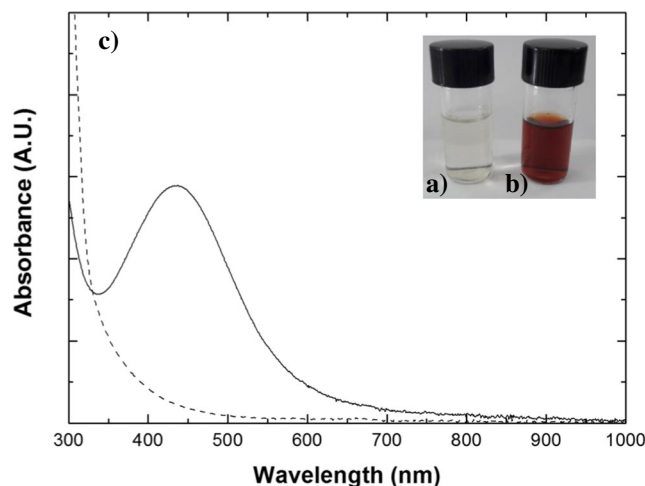


Fig. 1 (a) *Ulva* aqueous extract, (b) recently synthesized nanoparticles, (c) UV-vis absorption spectra of an Ag/AgCl NPs purified suspension (solid line) and *Ulva* aqueous extract (dash line) at room temperature

X-ray diffraction (XRD) studies The XRD spectrum of the Ag/AgCl NPs shows a pattern displaying diffraction peaks at around 27.7°, 32.1°, 46.1°, 54.8°, 57.4°, 67.5°, 74.5° and 76.7° (Fig. 2). These peaks show a good match with the reference peak positions of face-centred cubic (fcc) structure of silver chloride (space group Fm3m, Joint Committee on Power Diffraction Standard (JCPDS) file 31-1238). The most intense of these peaks, which is centred at 32.1°, is associated to the (200) planes of AgCl and has a corresponding mean coherence length value of $L_{200,AgCl} = 41(1)$ nm. In addition, less intense and rather wider peaks were found at approximately 38.1°, 44.3°, 64.4° and 77.5° and were associated to the (111), (200), (220) and (311) crystalline planes of fcc

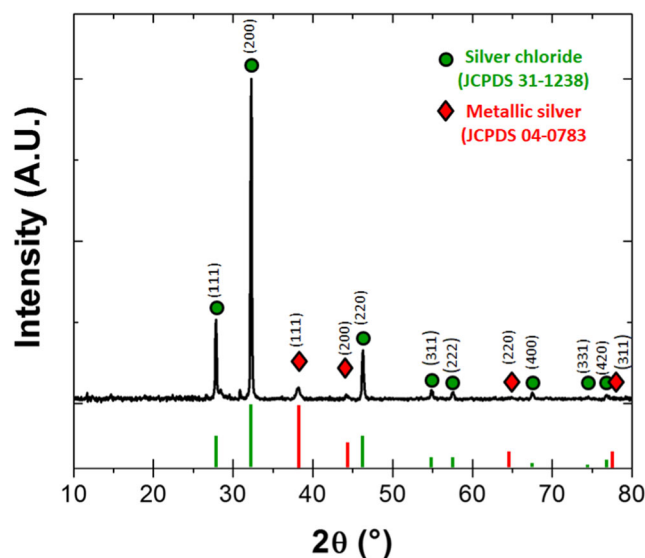


Fig. 2 XRD pattern of silver-based nanoparticles biosynthesized using an *Ulva* aqueous extract. Diffraction peaks match the reference positions of face-centred-cubic structures of AgCl (circles) or metallic Ag (diamonds)

metallic Ag structure, respectively (space group Fm3m, JCPDS file No. 04-0783). The average crystal size of this phase, estimated using the Scherrer equation and the position and width of the (111) peak, was $L_{111, Ag} = 18(1)$ nm.

Microstructural analyses Transmission electron microscopy (TEM) images (Fig. 3a) revealed that the sample was composed of spherical and irregular particles with different sizes, 90% being in the range from 5 to 20 nm and the rest of the particles from 20 to 35 nm. Consequently, the particle size distribution of the sample was fitted to a log-normal distribution. Particle size best-fitting central value and log-normal standard deviation were 9.5 and 0.44 nm, respectively (see insert image of Fig. 3a).

Selected area electron diffraction (SAED) patterns (Fig. 3b) exhibited spotty rings associated to both Ag and AgCl crystalline phases in agreement with the XRD results. Energy-dispersive X-ray (EDX) analysis (Fig. 3c) confirmed the presence of Ag, Cl and C in Ag/AgCl NPs (although the C peak partially comes from the lacey-carbon of the TEM grid). In addition, EDX spectrum often showed S peaks. The Cu peaks are due to background from the TEM grid. On the other hand, the presence of light elements, such as H, that are not detected using the EDX technique should not be discarded.

HRTEM images of the smallest nanoparticles (Figures S1a, S1c and S1e) displayed lattice fringes associated to a pure fcc Ag phase. Analysis of these micrographs by FFT (Figures S1b, S1d and S1f) revealed different microstructural characteristics in these particles, showing some to be polycrystalline (Figures S1a and S1e) with twinning boundaries and stacking faults (Figures S1c and S1f). However, nanoparticles with a rounded morphology and monocrystalline-like properties were also observed (Figures S1c and S1d), often along the [211] zone axis, and exhibited $\frac{1}{2}\{131\}$ classically forbidden reflections.

The microstructural investigation of the largest particles by HRTEM (Figure S2a) revealed that they usually display both metallic Ag and AgCl crystals. An illustrative example is presented in Figures S2a–d. Figure S2a is an HRTEM image of two particles that display lattice fringes with d-spacing values associated to both crystalline phases detected by XRD and SAED, and that were determined analysing the spots of the corresponding FFT images (Figure S2b). Fourier filtering of HRTEM images selecting only reflections of AgCl (Figure S2c) or Ag (Figure S2d) showed the distribution of these crystalline phases in the particles, indicating that the crystals of both phases tend to coalesce to form particles of 20 to 35 of nanometres in size.

Fig. 3 a) Representative TEM image of Ag/AgCl NPs synthesized using *Ulva* aqueous extract. The insert image shows the related size distribution. Solid red line corresponds to the best log-normal distribution fit. b) SAED pattern. The expected positions of the diffraction rings associated to the crystallographic planes of fcc metallic silver (JCPDS 04-0783) and silver chloride (JCPDS 31-1238) are indicated. c) EDX spectrum

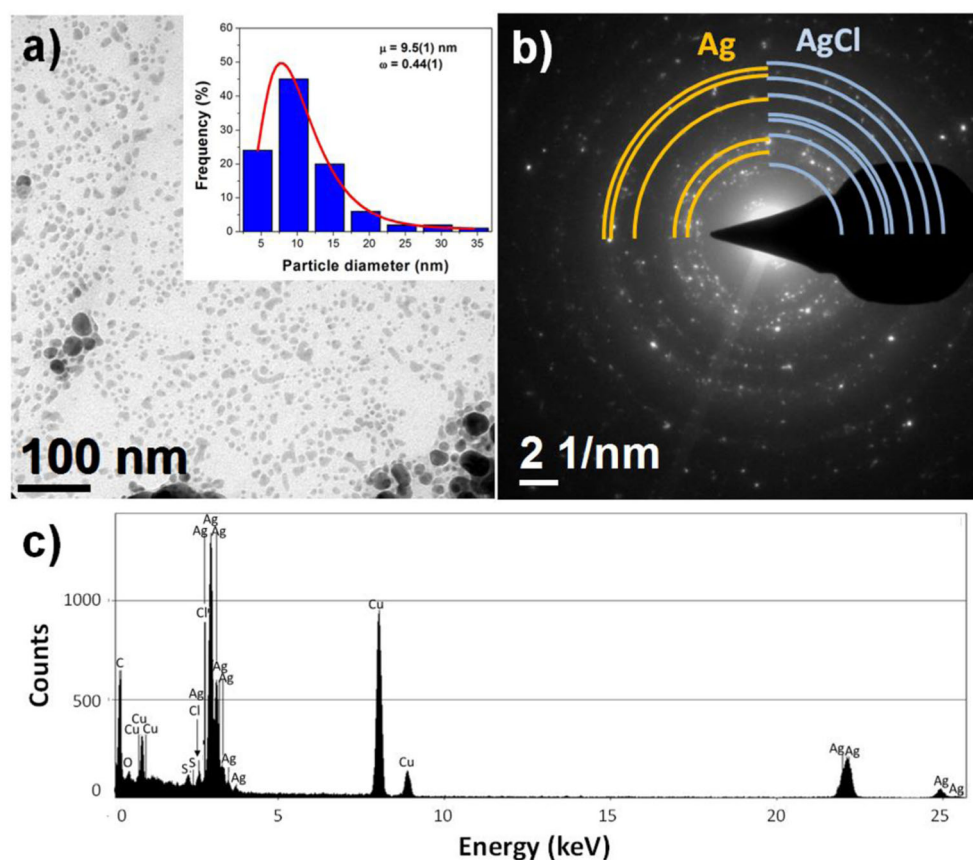
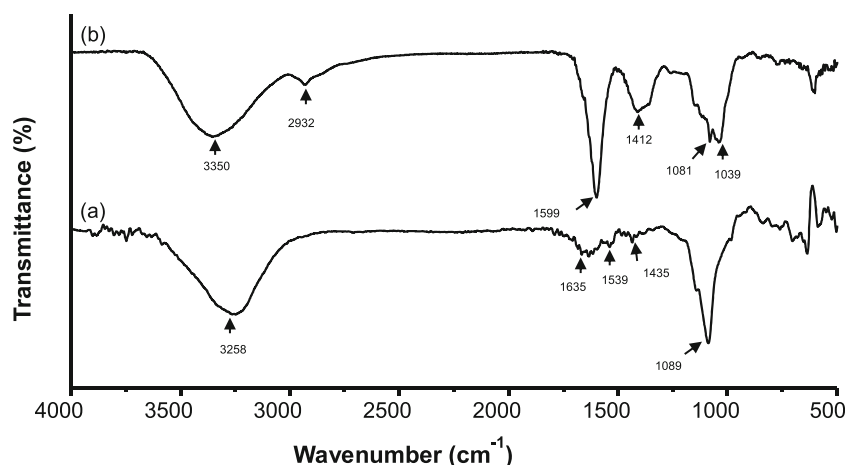


Fig. 4 FTIR spectra of (a) aqueous extract of *Ulva clathrata* and (b) Ag/AgCl NPs prepared using silver nitrate and the *Ulva clathrata* extract



Fourier transform infrared spectrum (FTIR) In the FTIR spectrum of the AEU (Fig. 4a), the most significant FTIR bands were found at 3258 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1539 cm^{-1} , 1435 cm^{-1} and 1089 cm^{-1} . The broad band observed in the wavenumber range of $3700\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ (centred at 3258 cm^{-1}) corresponded to O–H stretching vibrations from polysaccharides, polyphenols or proteins (Shanmugam et al. 2014). The peaks located at 1635 cm^{-1} and 1539 cm^{-1} were associated to the stretching vibration of the C=O group in peptides bound (amide I) and the N–H bending vibration (amide II) in proteins, respectively (Mendoza-Reséndez et al. 2013; Luna et al. 2015a, 2015b). The band located at 1435 cm^{-1} could potentially be due to C–N stretching vibration in amine or amide groups. The sharp and intense peak at 1089 cm^{-1} is due to C–N stretching vibration in aliphatic amines (Shanmugam et al. 2014) and C–O–C alcoholic groups associated with polysaccharides (Kora et al. 2012; Kannan et al. 2013b).

The Ag/AgCl NPs, after the purification process, presented major absorption bands at 3350 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 1599 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} , 1081 cm^{-1} and 1039 cm^{-1} . The broad band at 3350 cm^{-1} , ascribed to O–H stretching vibrations, appeared shifted with respect to the same band observed in the spectrum of the algae extract. The band located at 2932 cm^{-1} can be ascribed to C–H stretching vibrations in alkanes (Kora et al. 2012). In comparison with the FTIR spectrum of algae extract, an enhanced and shifted absorbance band appeared at 1599 cm^{-1} , suggesting modifications of the C=O and N–H stretching vibration in amine or amide groups due to these particles' involvement in the reduction process (Kannan et al. 2013b). The band at 1412 cm^{-1} could be ascribed to C–N stretching vibration of amine or amide groups. Also, the C–N stretching vibration band of aliphatic amines and C–O–C stretching vibration of alcoholic groups associated to polysaccharides (Kumar et al. 2012) appeared shifted at 1081 cm^{-1} and 1039 cm^{-1} , respectively.

Raman studies The Raman spectra of the algae extract used in the biosynthesis and the final product can be observed in Fig. 5. The spectrum of Ag-based particles displays highly

pronounced bands at 228 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} and 1595 cm^{-1} that are not observed in the algae extract spectrum. The sharp band at 228 cm^{-1} is attributed to stretching vibrations of Ag–N (Mukherjee et al. 2008; Kora et al. 2012) and Ag–O (Biswas et al. 2007; Kora et al. 2012) bonds, suggesting that proteins are bound to the particles' surface through amino and/or carboxylate (Kora et al. 2012). Moreover, intense bands at 1370 cm^{-1} and 1595 cm^{-1} were observed, which were associated to symmetric and asymmetric C=O stretching vibrations in the COO^- ions (Kora et al. 2012; Luna et al. 2015a, 2015b), respectively, and/or phenyl ring stretch (Biswas et al. 2007; Luna et al. 2015a, 2015b). Enhancement of the intensity of the C=O stretching vibrations bands indicates the direct binding of the COO^- group with the Ag surface (Kora et al. 2012).

Antibacterial activity

Disc diffusion assay The antibacterial test performed by disc diffusion showed significant differences in the growth inhibition zone diameter between the three *V. parahaemolyticus* strains ($p = 0.001$), for the products ($p = 0.001$) and in their

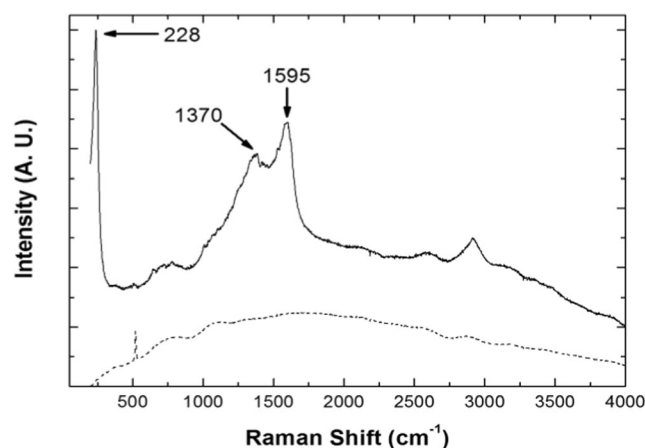


Fig. 5 Raman spectra of *Ulva clathrata* extract (dash line) and Ag/AgCl NPs (solid line)

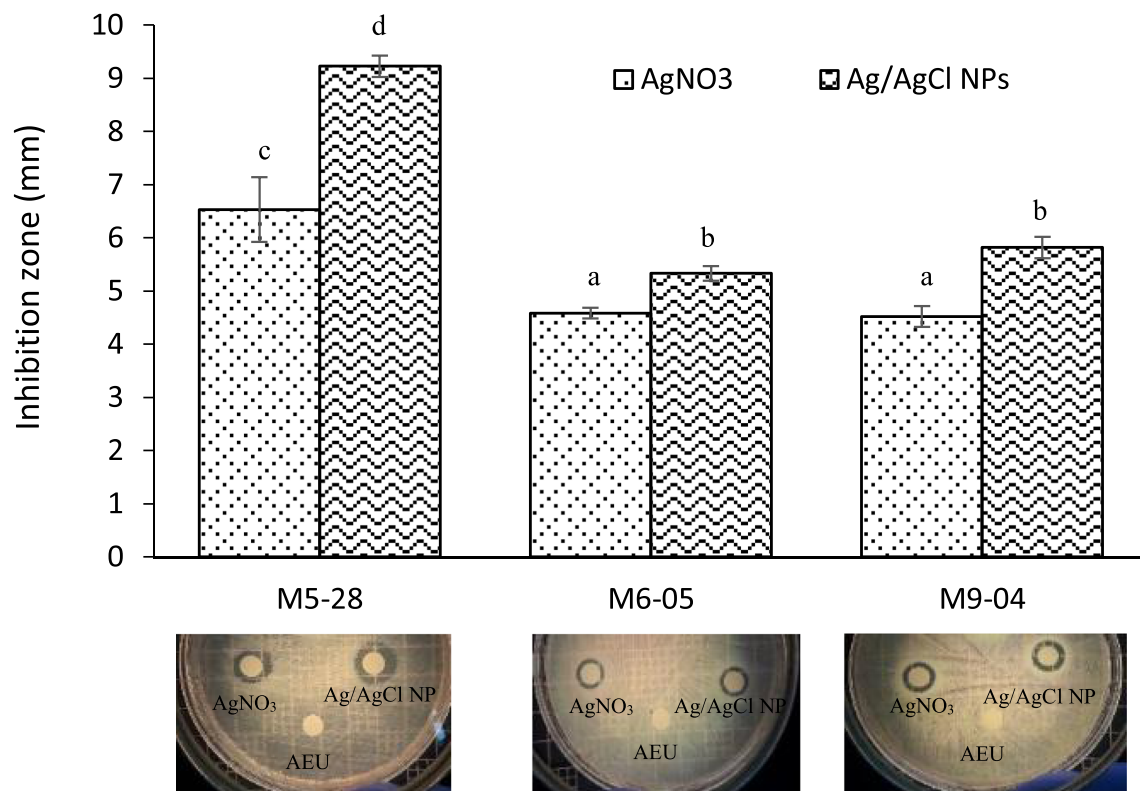


Fig. 6 Average inhibition zone diameters (mm) observed with diffusion method tested at similar concentrations (10 μg Ag per disc for Ag/AgCl NPs or AgNO₃). The error bars represent standard deviation (SD), and the data are means of three replicates ($n = 3$). The diameter of the paper disc is

not included (6 mm). Different letters (a–d) represent significant differences according to a Fisher LSD post hoc multiple mean comparison test among the six treatments

interaction ($p = 0.001$) with a two-way ANOVA (Fig. 6). The discs impregnated with Ag/AgCl NPs produced an IZ of 9.2 ± 0.2 , 5.3 ± 0.1 and 5.8 ± 0.2 mm for M5-28, M5-06 and M9-04 *V. parahaemolyticus* strains, respectively. The AgNO₃ solution tested at same concentration produced lower IZ than Ag/AgCl NPs, with values of 6.5 ± 0.6 , 4.6 ± 0.1 and 4.5 ± 0.2 mm for the three strains, respectively. In contrast, the AEU did not cause inhibition.

Microdilution assay The antibacterial test performed by microdilution assay was only done with the products that had obtained an IZ on the disc diffusion assay. The Ag/AgCl NP solution presented a minimum inhibitory concentration

(MIC) of $3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ for all strains tested, while the AgNO₃ solution showed a MIC of $1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *V. parahaemolyticus* M5-28 and M6-05 strains, and of $3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *V. parahaemolyticus* M9-04. The Ag/AgCl NP solution showed a minimum bactericide concentration (MBC) of $6.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the three strains, while the AgNO₃ solution presented an MBC of $3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ for M5-28 and M6-05 strains, and of $6.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ for M9-04 (Table 1).

Short-term evaluation in vivo test

Stability of nanoparticles in supplemented feed Ag contents in the experimental feeds are shown in Table 2. The leached

Table 1 In vitro antimicrobial activity of NPs vs AgNO₃ solutions as evidenced by microdilution assays ($n = 3$)

Vp strain	Ag/AgCl NPs		AgNO ₃	
	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
M5-28	3.2	6.3	1.6	3.2
M6-05	3.2	6.3	1.6	3.2
M9-04	3.2	6.3	3.2	6.3

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

Table 2 Concentrations of Ag in experimental diets and in water after leaching (means \pm standard deviation, $n = 3$)

Theoretical concentrations ^a	Concentrations ^a in pellets before leaching	Concentrations ^a in pellets after leaching	Concentrations in water ^b after leaching
0	< 1	< 1	0.07 \pm 0.03
10	12.73 \pm 1.74	14.08 \pm 0.75	0.14 \pm 0.02
100	85.90 \pm 4.58	90.75 \pm 13.28	0.18 \pm 0.09
1000	827.59 \pm 50.96	936.77 \pm 142.49	0.37 \pm 0.19
10 000	9 971.10 \pm 612.69	10 272.11 \pm 483.34	5.01 \pm 1.50

^a mg Ag kg⁻¹ dry matter^b mg Ag L⁻¹

feed had higher Ag content compared with the initial feed, and the nanoparticles lost from the feed surface to the seawater after 1 h were less than 5%.

Short-term acute toxicity in vivo (first test) and Ag distribution in tissues During the first short-term feed exposure test, the organisms showed no behavioural changes and survival was 100% for all treatments. The consumption of supplemented feed for 7 days did not cause significant changes in feed conversion but did affect weight gain (%), which was slightly improved in shrimp consuming feeds supplemented with 10 and 100 mg Ag kg⁻¹ feed, and slightly (but not significantly) depressed in those consuming feeds with 10,000 mg Ag kg⁻¹ (Table 3). In contrast, the hepatosomatic index (HPI) showed a significant reduction with the consumption of feeds supplemented with high doses (1000 and 10,000 mg Ag kg⁻¹; Fig. 7a).

Average concentration values of Ag were reported for different organ pools analysed at the end of 7 days of supplemented feed consumption (Fig. 1; hepatopancreas 7b, cephalothorax cuticle 7c and muscle 7d). A greater bioaccumulation of Ag was observed in hepatopancreas showing a dose-dependent relation of up to 1500 mg kg⁻¹ dry weight (dw), while concentrations in cuticle and muscle were lower than 8 mg kg⁻¹ dw. The hepatopancreas and cuticle Ag content became significantly different when diets contained 1000 and 10,000 ppm Ag. In contrast, muscle Ag contents did not change significantly with any treatment.

Depuration parameters (second test) The depuration rate (k_2), assimilation efficiency (α), half-life time ($t_{1/2}$) and biomagnification factor (BMF) could be determined for hepatopancreas and gills only (Fig. 8). The model used for calculating depuration parameters was not applicable in muscle

Table 3 Growth performance of *L. vannamei* juveniles fed for 7 days pelleted feeds supplemented with Ag/AgCl NPs at graded levels (from 0 to 10,000 mg Ag kg⁻¹ feed, means \pm standard deviation, $n = 3$)

Parameters	Experimental diets (mg Ag kg ⁻¹ feed)					<i>p</i> value
	0	10	100	1000	10,000	
Shrimp weight						
Mean initial body weight (g)	0.441 \pm 0.012	0.444 \pm 0.005	0.438 \pm 0.002	0.438 \pm 0.009	0.440 \pm 0.002	0.851
Mean final body weight (g)	0.512 \pm 0.010	0.540 \pm 0.005	0.534 \pm 0.013	0.508 \pm 0.011	0.498 \pm 0.023	0.232
Shrimp feed intake						
Mean feed offered (g feed g ⁻¹ shrimp day ⁻¹)	0.050 \pm 0.00	0.050 \pm 0.00	0.050 \pm 0.00	0.050 \pm 0.00	0.050 \pm 0.00	1.000
Consumption of Ag/AgCl NPs (mg Ag g ⁻¹ shrimp day ⁻¹)	0.00 ^a	0.64 \pm 0.00 ^a	4.3 \pm 0.0 ^b	41.4 \pm 0.0 ^c	499.0 \pm 0.0 ^d	< 0.001
Shrimp growth and feed response						
Weight gain (% WG)	16.1 \pm 0.9	21.7 \pm 1.0	21.9 \pm 2.6	16.0 \pm 2.1	13.1 \pm 5.1	0.185
Feed conversion ratio (FCR)	5.0 \pm 0.3	3.6 \pm 0.2	3.8 \pm 0.5	5.2 \pm 0.8	8.1 \pm 2.7	0.189
Shrimp survival (% S)	100	100	100	100	100	0.999

% WG = [(final mean weight – initial mean weight) / initial mean weight] \times 100

FCR = total feed provided (g) / weight gain (g)

% S = (number of live organisms / initial number of organisms per tank) \times 100

Superscript letters indicate different homogeneous subsets as determined by the Tukey multiple means comparison test

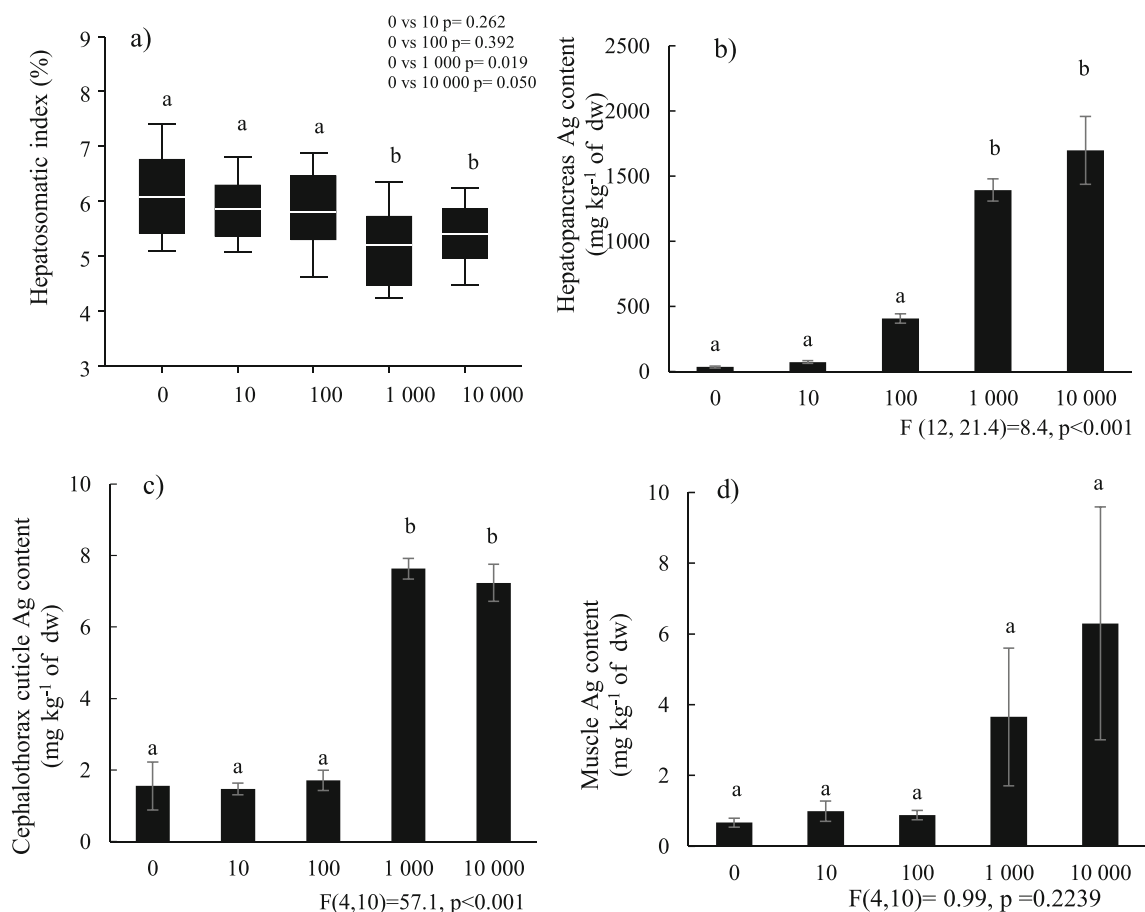


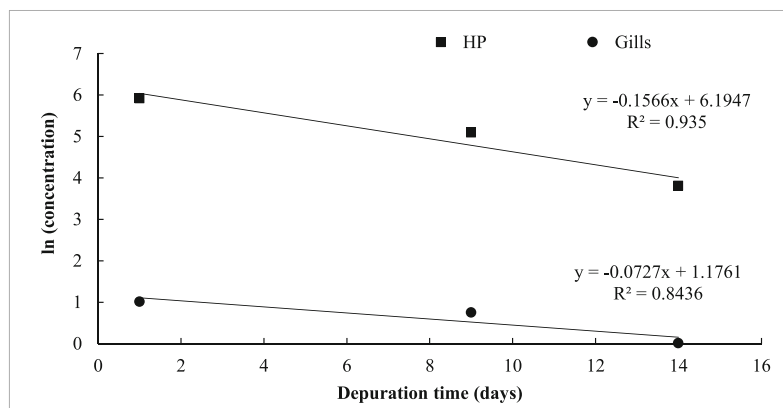
Fig. 7 **a)** Hepatosomatic index (HPI) box diagram ($n = 3$) and Ag bioaccumulation in shrimp tissues, **b)** hepatopancreas ($n = 12$), **c)** cephalothorax cuticle ($n = 4$) and **d)** muscle ($n = 4$) after consumption for 7 days of feeds supplemented with Ag/AgCl NPs at graded levels (from 0 to 10,000 mg Ag kg⁻¹ feed). **a)** The white line represents the average HPI

value ($n = 3$), letters on top of the bars indicate the absence (a) or presence (b) of a significant difference to the control group (Dunnett test). **b)–d)** Letters on top of the bars indicate different homogeneous subsets as determined by a Tukey multiple means comparison test. Error bars represent SD for all figures

tissue due to low Ag concentrations. However, results indicate that the hepatopancreas has higher k_2 and α values (0.156 day⁻¹ and 33.053%, respectively) than gills (0.072 day⁻¹

and 0.169%). The 50% depuration time (or $t_{1/2}$) was shorter in gills than in hepatopancreas, at 4.4 and 9.5 days, respectively. The hepatopancreas showed a high food biomagnification

Fig. 8 Kinetics of depuration model $\ln(\text{concentration})$ of the Ag content in gills and hepatopancreas



Tissue	Depuration rate K_2 (day ⁻¹)	Assimilation efficiency α_g (%)	Half-life time $t_{1/2}$ (day)	BMF (L kg ⁻¹)
Gills	0.072	0.169	9.534	0.116
Hepatopancreas	0.156	33.053	4.426	10.553

factor (BMF) value of 10.553, while the gills had a 0.116 value. Finally, depuration of Ag accumulated in hepatopancreas and gills was already 89 and 99%, respectively, after only 14 days of depuration (i.e. consuming the feed without Ag/AgCl NPs).

Discussion

AgNPs exhibit an intense absorption peak in the UV-vis spectrum due to the SPR. According to Mie's theory, the form, width, height and the number of SPR peaks are strongly related with shape, particle size, concentration and distribution of the particles, respectively (Sun and Xia 2002; Dehnavi et al. 2013). The location and form of the single SPR peak observed for the purified Ag/AgCl NPs demonstrate the presence of spherical particles smaller than 100 nm, with a log-normal distribution. These results are in agreement with the SPR spectra reported by other authors for AgNPs or AgCl NPs (Choi et al. 2008; Mendoza-Reséndez et al. 2013; Dhas et al. 2014; Pal et al. 2015).

Ethanol is frequently used as an antisolvent to help recover the particles selectively (McLeod et al. 2005; Liu et al. 2009), in combination with centrifugation, in order to eliminate the ionic silver that had not reacted during the synthesis; additionally, centrifugation may be used to fraction particles by size (Novak et al. 2001; Pal et al. 2015). The final Ag concentration after the particle purification process was lower than the initial concentration due to elimination of Ag from the initial mixture.

The signals from the crystallographic planes on the XRD analysis indicate the presence of Ag and AgCl particles. The formation of these particles could be due to the interaction of the silver ions with chloride ions present in the *Ulva* extract. The presence of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ is typical in macroalgae given that they are the main ions responsible for maintaining internal osmotic pressure (Lee and Liu 1999). Similar results have been reported by Dhas et al. (2014) and Venkatesan et al. (2016) regarding the biosynthesis of AgNPs with aqueous extracts of the brown algae *Sargassum plagiophyllum* and *Ecklonia cava*.

Synthesized NPs mediated by natural extracts also present special and unique morphological and microstructural characteristics, which are strongly linked to the reducing agent's composition. Ag/AgCl NPs exhibited a heterogeneous morphology, with a predominance of spherically and irregularly shaped particles. This is in agreement with reports from several authors of spherical, irregular and triangular particle shapes of NPs synthesized with green algae extracts (Yousefzadi et al. 2014; Sharma et al. 2016; Vijayan et al. 2016). Ag/AgCl NPs' sizes, as measured by TEM, are also similar to that of other AgNPs synthesized with green algae extracts. These authors report a range from 5 to 210 nm (Devi and Bhimba 2012; Kannan et al. 2013a; Abirami and

Kowsalya 2015; Sharma et al. 2016; Ramkumar et al. 2017). Particle size is relevant in this study given that the biological activity of NPs is strongly associated to their size distribution (Dehnavi et al. 2013).

Microstructural studies by SAED and EDX confirmed that particles are composed mostly of Ag and Cl, followed by C, S and O. These signals can likely be attributed to adsorbed proteins and sulphated polysaccharides (ulvan) coming from the extract composition. HRTEM studies exhibited two types of particles: The first are small, spherical and monocrystalline composed by only Ag phase, while the second are large, irregular and polycrystalline composed of Ag and AgCl phases. In addition, stacking faults were found in the morphology of large particles. This property and the irregular particle form are due to a growth in particle size by coalescence of smaller particles that seek to stabilize within the medium. This phenomenon has been reported briefly in AgNPs synthesized using natural extracts (Mendoza-Reséndez et al. 2013, 2014). There is only one previous report of gold particles with stacking faults. In that study, particles were synthesized using an aqueous extract of a unicellular green alga (*Chlorella vulgaris*), and the faults were attributed to particle growth and stabilization (Xie et al. 2007).

Seaweeds constitute an inexhaustible source of bioactive compounds and therefore are considered an important resource in biotechnology (Rauwel et al. 2015). Some biomolecules extracted from green algae, such as polysaccharides, peptides, phenolic compounds and pigments, are responsible for metal bioreduction during NP manufacture, because these compounds contain in their structure reducing functional groups like hydroxyl (–OH), carbonyl (–COOH), primary and secondary amines (–NH, –NH₂), alcohol and aldehydes (–CHO) (El-Kassas et al. 2014; Yousefzadi et al. 2014; Ramkumar et al. 2017). FTIR and Raman analyses confirmed the presence in the AEU of functional groups from biomolecules, mainly proteins, sulphated polysaccharides, and polyphenols that are adsorbed to the surface and microstructure of Ag/AgCl NPs. According to several authors who reported similar vibrations in FTIR studies of NPs synthesized with green algae extracts, these molecules are the main compounds responsible for reducing and buffering nanoparticles (El-Kassas et al. 2014; Ramkumar et al. 2017), making them more stable, and for a longer time, than those chemically synthesized (Vijayan et al. 2016). Additionally, these compounds may contribute novel and unique properties, as well as potential applications, for the corresponding NPs (Nezamdoost et al. 2014).

The antibacterial activity of the Ag/AgCl NPs obtained in the present study agreed with several authors who reported IZ with AgNPs or colloidal Ag in the range of 4.0 to 16.5 mm against *V. parahaemolyticus* AHPND⁺ (Morales-Covarrubias et al. 2016; Sivaramasamy and Zhiwei 2016; Sivaramasamy et al. 2017) and 10 to 14.27 mm against *Vibrio harveyi* (Kandasamy et al. 2012; Sivaramasamy and Zhiwei 2016).

Sivaramasamy et al. (2017) reported similar results for AgNO₃ IZ ranging from < 1 to 4.6 mm for a strain of *V. parahaemolyticus* that causes AHPND (the diameter of the paper disc was not included for all results and comparisons in this paper). This result is interesting because Ag⁺ ions arising from solutions of AgNO₃ usually exhibit more prominent effects in growth inhibition against bacteria than AgNPs (Choi et al. 2008). Some authors have reported antibacterial activity of *Ulva* sp. extracts (made with solvents of different polarities) against *Vibrio* and other important strains for human health (Rebecca et al. 2012; Saritha et al. 2013). However, in our case, AEU antibacterial activity was not observed. This result may be due to a difference in bacteria sensibility, *Ulva* species or the extraction method. Nevertheless, the compounds extracted with water from *U. clathrata* had an excellent reducing and stabilizing activity for the formation of NPs. Among the *V. parahaemolyticus* strains evaluated, M5-28 presented the highest susceptibility.

The minimum inhibitory concentration (MIC) represents the lowest concentration of antibacterial solution inhibiting bacterial growth. In contrast, the minimum bactericidal concentration (MBC) represents the lowest concentration of antibacterial solution required to kill more than 99.9% of the initial bacterial population (Petrus et al. 2011). The MIC and MBC values obtained for Ag/AgCl NP were below those reported by Petrus et al. (2011), where colloidal Ag was evaluated against other *Vibrio* strains reporting a MIC of 9.64 µg mL⁻¹ and a MBC > 100 µg mL⁻¹. In contrast, MIC and MBC values for colloidal Ag against a strain of *Vibrio* causing AHPND reported by Morales-Covarrubias et al. (2016) were lower (2 µg mL⁻¹).

The differences between theoretical and measured Ag concentrations in supplemented feeds could be due to the manipulation during the preparation process, coupled with the analytical error. However, these differences with respect to nominal concentrations were acceptable. The increase shown in the Ag concentrations in feed after leaching can be attributed to the loss of soluble nutrients such as proteins (amino acids) and sugars, while less soluble ingredients, or those that do not leach in the water, were actually concentrated in the immersed feed. This result confirms that dietary exposure is a good and stable way to deliver NPs and to evaluate their effect in shrimp. Nevertheless, further studies regarding the residual content in shrimp feces and their final disposal are needed to inform future applications in shrimp aquaculture.

During the first in vivo test, consumption of feeds supplemented at low concentrations (10 and 100 ppm) had a positive effect on growth. This result coincides with survival and growth results reported by Sivaramasamy and Zhiwei (2016), who fed *L. vannamei* shrimp (6.82 ± 2.16 g) with a concentration of 10,000 ppm *Bacillus subtilis*-synthesized AgNPs for 65 days. In contrast, feeds supplemented at high concentrations (1000 and 10,000 ppm) likely resulted in moderate liver damage (non-

visible), as suggested by a significant reduction in HPI. This negative effect on HPI, followed by histological damage, has been reported in trout after 8 weeks of being exposed to water with NPs at concentrations of 3300 and 1000 mg Ag L⁻¹ (Monfared and Soltani 2013). However, there are no similar studies in shrimp allowing a comparison with our results in terms of HPI reduction and toxicity of dietary AgNPs.

In terms of bioaccumulation and biodistribution, the highest Ag concentrations found in hepatopancreas were not surprising, since the crustacean hepatopancreas gland can be considered a 'target organ' for the accumulation of many types of substances. In addition to performing important functions, such as secreting digestive enzymes, serving as the main site for food adsorption, and storing metabolic reserves, this organ also contains vesicles with metal-binding proteins that allow it to sequester heavy metals and other types of substances (Carvalho et al. 1999). In contrast, muscle showed practically no bioaccumulation, which is desirable given that it represents the most edible portion of the shrimp. However, medium-intensity bioaccumulation in the cephalothorax cuticle suggests that shell-on shrimp tails could contain certain levels of residual Ag. In this regard, several studies have found that the biodistribution and toxicity of nanoparticles are strongly influenced by particle size, shape, surface charge, surface coating and solubility (Sivaramasamy and Zhiwei 2016).

In addition, results suggest that shrimp have a fast Ag depuration capacity. This is mostly carried out by the hepatopancreas, which showed the highest depuration rates, similar to what was previously seen in the assimilation efficiency. The BMF value indicates how many times the Ag feed content can be biomagnified by hepatopancreas, which in this case indicates an Ag biomagnification capacity of ten times more than that administered by feed exposure.

Ag half-life times of 4 to 9 days were found in the tissues sampled during the depuration study (hepatopancreas, gills and muscle). This means that waiting an additional half-life period can eliminate 50% of the residual Ag. These values are lower than (but rather congruent with) that previously reported by Metian et al. (2010), who showed a *t*_{1/2} value of 10.8 ± 2 days for the depuration of *Litopenaeus stylirostris* after dietary exposure to radiolabeled Ag⁺.

Several authors have studied the bioaccumulation and purification of noble and heavy metals including ionic, radiolabeled or complexed silver in crustaceans. Their purpose was to establish the current state of accumulation, distribution and migration within the trophic chain of metals that were a product of contamination in the ecosystem. The main objective of our study is not centered around metal contamination in aquatic systems but rather aims to provide information on next-generation antibacterial products manufactured using nanotechnology, and to promote appropriate doses that would have minimal impact on biological systems.

Conclusions

In vitro antibacterial activity studies herein suggest that Ag/AgCl NPs synthesized for the first time with aqueous extract of cultivated *U. clathrata* seaweed have a potential use for the management of Vp AHPND⁺. In addition, consumption of Ag/AgCl NPs through dietary exposure for 7 days had no lethal effects on shrimp. Finally, shrimp hepatopancreas has a rapid capacity for bioaccumulation and purification, while Ag accumulation was lower in cuticles and insignificant in muscle tissue. This suggests that headless, peeled shrimp could be safer than shell-on presentations. Results also indicate that Ag/AgCl NPs could be an effective treatment against AHPND⁺ in farms. However, further studies are required to properly establish safe parameters when using Ag/AgCl NPs against *V. parahaemolyticus* AHPND⁺ infections, as well as to investigate the specific effects of Ag/AgCl NPs on shrimp immune system and histology. Through additional research, we hope to provide a broader picture of the necessary considerations for the application of NPs as an antibacterial additive in shrimp feeds.

Acknowledgements The authors sincerely thank the company FITMAR for their support with the organisms used during the experimental tests in this research project.

Author contributions statement MM-M synthesized the particles, performed the experiments, analysed the results and wrote the manuscript. CL conceived the synthesis and characterization of particles. RM-R conceived the synthesis and characterization of particles. EDB-C performed the characterization studies. SS-R provided the bacterial strains and conceived the microbiological studies. DR-M performed statistical and mathematical analyses, and wrote the manuscript. LEC-S designed and conceived all the experiments and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Funding information This study was part of the project 'Evaluación multidisciplinaria del potencial nutraceutico de macroalgas en camarones y murinos y su repercusión en el manejo de enfermedades bacterianas y metabólicas', which received financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Ciencia Basica #2014-238458).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abdel-Raouf N, Al-Enazi NM, Ibraheem IBM (2017) Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity. Arab J Chem 10:S3029–S3039
- Abirami RG, Kowsalya S (2015) *Ulva fasciata* nanoparticles characterization and its anticancer activity. World J Pharm Pharm Sci 4: 1164–1175
- Aguirre-Guzmán G, Ruiz HM, Ascencio F (2004) A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Aquac Res 35:1395–1404
- AOAC (ed) (1997) Official Method of Analysis, 16th edn. AOAC International, Gaithersburg
- Biswas N, Kapoor S, Mahal HS, Mukherjee T (2007) Adsorption of CGA on colloidal silver particles: DFT and SERS study. Chem Phys Lett 444:338–345
- Carvalho RA, Benfield MC, Santschi PH (1999) Comparative bioaccumulation studies of colloiddally complexed and free-ionic heavy metals in juvenile brown shrimp *Penaeus aztecus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Limnol Oceanogr 44:403–414
- Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L Jr, Surampallie RY, Hu Z (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. Water Res 42:3066–3074
- Conapesca (2017) Anuario estadístico de acuacultura y pesca. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, Mazatlan, Sinaloa, Mexico. pp 28 https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf. Access 26 Oct 2019
- Connolly M, Fernández M, Conde E, Torrent F, Navas JM, Fernandez-Cruz ML (2016) Tissue distribution of zinc and subtle oxidative stress effects after dietary administration of ZnO nanoparticles to rainbow trout. Sci Total Environ 551–552:334–343
- Cruz-Suarez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-Lopez MG, Guajardo-Barbosa C, Ricque-Marie D (2009) Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. Aquac Nutr 15:421–430
- Cruz-Suarez LE, León A, Peña-Rodríguez A, Rodríguez-Peña G, Moll B, Ricque-Marie D (2010) Shrimp/*Ulva* Co-Culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. Aquaculture 301:64–68
- Cruz-Suarez LE, Nieto-Lopez M, Tapia-Salazar M, Maldonado-Muñoz M, Villarreal-Cavazos D, Ricque-Marie D (2013) Avances en la valoración de macroalgas del género *Ulva* como nutraceutico en *Litopenaeus vannamei*. In: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-Lopez MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-delgado J, Alvarez-Gonzalez C (eds) Contribuciones recientes en alimentacion acuicola. Universidad Autonoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, pp 553–598 https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/xii/LibroCRANA-ISBN.pdf. Access 08 July 2018
- Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Curr Opin Microbiol 14:251–258
- Dehnavi AS, Raisi A, Aroujalian A (2013) Control size and stability of colloidal silver nanoparticles with antibacterial activity prepared by a green synthesis method. Synth React Inorganic Met Nano-Metal Chem 43:543–551
- Devi JS, Bhimba BV (2012) Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed *Ulva lactuca* In vitro. J Nanomedicine Biotherapeutic Discov 1:1–5
- Dhas TS, Kumar VG, Karthick V, Jini AK, Govindaraju K (2014) Facile synthesis of silver chloride nanoparticles using marine alga and its antibacterial efficacy. Spectrochim Acta A 120:416–420
- El-Kassas EK, El-Kassas H, E-K MM (2014) Biogenic silver nanoparticles using seaweed *Ulva rigida* and their fungicidal and cytotoxic effects. JKAU Mar Sci 25:3–20
- Ibañez E, Herrero M, Mendiola JA, Castro-Puyana M (2012) Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: Macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: Hayes M (ed) Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications. Springer US, Boston, pp 55–98
- Joshi J, Srisala J, Truong VH, Chen I-T, Nuangsaeng B, Suthienkul O, Lo CF, Flegel TW, Sritunyalucksana K, Thitamadee S (2014) Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm

- experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture* 428:297–302
- Kandasamy K, Alikunhi NM, Manickaswami G, Nabikhan A, Ayyavu G (2012) Synthesis of silver nanoparticles by coastal plant *Prosopis chilensis* (L.) and their efficacy in controlling vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *Appl Nanosci* 3:65–73
- Kannan RRR, Arumugam R, Ramya D, Manivannan K, Anantharaman P (2013a) Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalgae *Chaetomorpha linum*. *Appl Nanosci* 3:229–233
- Kannan RRR, Stirk WA, Van Staden J (2013b) Synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Codium capitatum* P.C. Silva (Chlorophyceae). *S Afr J Bot* 86:1–4
- Kora AJ, Sashidhar RB, Arunachalam J (2012) Aqueous extract of gum olibanum (*Boswellia serrata*): A reductant and stabilizer for the biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles. *Process Biochem* 47:1516–1520
- Kumar P, Selvi SS, Prabha AL, Kumar KP, Ganeshkumar RS, Govindaraju M (2012) Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. *Nano Biomed Eng* 4:12–16
- Laramore S, Baptiste R, Wills PS, Hanisak MD (2018) Utilization of IMTA-produced *Ulva lactuca* to supplement or partially replace pelleted diets in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a clear water production system. *J Appl Phycol* 30:3603–3610
- Lee T-M, Liu C-H (1999) Correlation of decreased calcium contents with proline accumulation in the marine green macroalgae *Ulva fasciata* exposed to elevated NaCl contents in seawater. *J Exp Bot* 50:1855–1862
- Liu J, He F, Gunn TM, Zhao D, Roberts CB (2009) Precise seed-mediated growth and size-controlled synthesis of palladium nanoparticles using a green chemistry approach. *Langmuir* 25:7116–7128
- Luna C, Cruz-Suarez LE, Mendoza-Resendez R, Ricque-Marie D, Gonzalez-Dueñas C, Maldonado-Muñoz M (2015a) Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI) Solicitud de Patente MX/a/2015/002621 <https://siga.impi.gob.mx/newSIGA/content/common/principal.jsf>. Access 26 Oct 2019
- Luna C, Chávez VH, Barriga-Castro ED, Nuñez N, Mendoza-Resendez R (2015b) Biosynthesis of silver fine particles and particles decorated with nanoparticles using the extract of *Illicium verum* (star anise) seeds. *Spectrochim Acta A* 141:43–50
- McLeod MC, Kitchens CL, Roberts CB (2005) CO₂-expanded liquid deposition of ligand-stabilized nanoparticles as uniform, wide-area nanoparticle films. *Langmuir* 21:2414–2418
- Mendoza-Reséndez R, Nuñez NO, Barriga-Castro ED, Luna C (2013) Synthesis of metallic silver nanoparticles and silver organometallic nanodisks mediated by extracts of *Capsicum annum* var. *aviculare* (piquin) fruits. *RSC Adv* 3:20765–20771
- Mendoza-Reséndez R, Gómez-Treviño A, Barriga-Castro ED, Nuñez N, Luna C (2014) Synthesis of antibacterial silver-based nanodisks and dendritic structures mediated by royal jelly. *RSC Adv* 4:1650–1658
- Metian M, Hédouin L, Eltayeb MM, Lacoue-Labarthe T, Teyssié JL, Mugnier C, Bustamante P, Warnau M (2010) Metal and metalloid bioaccumulation in the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) from New Caledonia: Laboratory and field studies. *Mar Pollut Bull* 61:576–584
- Monfared AL, Soltani S (2013) Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. *Pelagia Res Libr* 3:285–289
- Morales-Covarrubias MS, García-Aguilar N, Bolan-Mejía MDC, Puelló-Cruz AC (2016) Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Dis Aquat Org* 122:57–65
- Mukherjee P, Roy M, Mandal BP, Dey GK, Mukherjee PK, Ghatak J, Tyagi AK, Kale SP (2008) Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology* 19:1–7
- Nezamdoost T, Bagherieh-Najjar MB, Aghdasi M (2014) Biogenic synthesis of stable bioactive silver chloride nanoparticles using *Onosma dichroantha* Boiss. root extract. *Mater Lett* 137:225–228
- Nieto-López M, Tapia-Salazar M, Ricque-Marie D, Villarreal-Cavazos D, Lemme A, Cruz-Suarez LE (2011) Digestibility of different wheat products in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 319:369–376
- Novak JP, Nickerson C, Franzen S, Feldheim DL (2001) Purification of molecularly bridged metal nanoparticle arrays by centrifugation and size exclusion chromatography. *Anal Chem* 73:5758–5761
- OECD (2005) OECD Detailed review paper on aquatic arthropods in life cycle and two-generation toxicity tests. OECD Environment Health and Safety Publications, OECD Publishing, Paris, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/34241659.pdf>. Accessed 15 Feb 2017
- OECD (2012) Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris <https://doi.org/10.1787/9789264185296-en>
- OIE (2014) Antimicrobial use in aquatic animals. In: Aquatic animal health code, Seventeenth. World organisation for animal health, Paris, pp 109–117
- Pal S, Tak YK, Song JM (2015) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 290:1712–1720
- Peña-Rodríguez A, León A, Moll B, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos D, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE (2010) Uso de *Ulva clathrata* en la nutrición del camarón blanco: revisión. En: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, TapiaSalazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos A, Gamboa-Delgado J (Eds), *Avances en Nutrición Acuicola X - Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuicola*, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp 700–712
- Peña-Rodríguez A, Mawhinney TP, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE (2011) Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chem* 129:491–498
- Petrus EM, Tinakumari S, Chai LC, Ubong A, Tunung R, Elexson N, Chai LF, Son R (2011) A study on the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of nano colloidal silver on food-borne pathogens. *Int Food Res J* 18:55–66
- Prasad TNV, Kambala VSR, Naidu R (2013) Phyconanotechnology: synthesis of silver nanoparticles using brown marine algae *Cystophora moniliformis* and their characterisation. *J Appl Phycol* 25:177–182
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27:76–83
- Ramkumar VS, Pugazhendhi A, Gopalakrishnan K, Sivagurunathan P, Saratale GD, Dung TNB, Kannapiran K (2017) Biofabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of seaweed *Enteromorpha compressa* and its biomedical properties. *Biotechnol Rep* 14:1–7
- Rauwel P, Küünl S, Ferdov S, Rauwel E (2015) A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. *Adv Mater Sci Eng* 2015:1–9
- Rebecca LJ, Dhanalakshmi V, Sharmila S (2012) Effect of the extract of *Ulva* sp on pathogenic microorganisms. *J Chem Pharm Res* 4:4875–4878
- Saritha K, Mani AE, Priyalaxmi M, Patterson J (2013) Antibacterial activity and biochemical constituents of seaweed *Ulva lactuca*. *Glob J Pharmacol* 7:276–282
- Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42:321–324

- Shanmugam N, Rajkamal P, Cholan S, Kannadasan N, Sathishkumar K, Viruthagiri G, Sundaramanickam A (2014) Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed *Sargassum wightii* and their antibacterial activity against some human pathogens. *Appl Nanosci* 4:881–888
- Sharma A, Sharma S, Sharma K, Chetri S, Vashishtha A, Singh P, Kumar R, Rath B, Agrawa V (2016) Algae as crucial organisms in advancing nanotechnology: a systematic review. *J Appl Phycol* 28:1759–1774
- Singh CR, Kathiresan K, Anandhan S (2015) A review on marine based nanoparticles and their potential applications. *Afr J Biotechnol* 14:1525–1532
- Sirvakumar K, Kannappan S, Masilamani D, Prasanna KP (2014) Evaluation of marine macro alga, *Ulva fasciata* against bioluminescent causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. *Afr J Microbiol Res* 8:803–813
- Sivaramasamy E, Zhiwei W (2016) Enhancement of vibriosis resistance in *Litopenaeus vannamei* by supplementation of biomastered silver nanoparticles by *Bacillus subtilis*. *J Nanomed Nanotechnol* 7:1–10
- Sivaramasamy E, Zagorsek K, Li F, Xiang J (2017) In situ synthesis of silver nanoparticles into TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose and their antivibriocidal activity against shrimp pathogens. *Carbohydr Polym* 166:329–337
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, Betancourt-Lozano M, Morales-Covarrubias MS (2015) Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol* 81:1689–1699
- Sun Y, Xia Y (2002) Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science* 298:2176–2179
- Swain P, Sasmal A, Nayak SK, Barik S, Mishra SS, Mohapatra KD, Swain SK, Saha JN, Sen AK, Jayasankar P (2014) Evaluation of selected metal nanoparticles on hatching and survival of larvae and fry of Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*). *Aquac Res* 47:498–511
- Venkatesan J, Kim S-K, Shim M (2016) Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using marine algae *Ecklonia cava*. *Nanomaterials* 6:1–18
- Vieira AP, Stein EM, Andreguetti DX, Colepicolo P, da Costa Ferreira AM (2016) Preparation of silver nanoparticles using aqueous extracts of the red algae *Laurencia aldingensis* and *Laurenciaella* sp. and their cytotoxic activities. *J Appl Phycol* 28:2615–2622
- Vijayan SR, Santhiyagu P, Ramasamy R, Aravalagan P, Kumar G, Ethiraj K, Ramaswamy BR (2016) Seaweeds: A resource for marine bionanotechnology. *Enzym Microb Technol* 95:45–57
- Xie J, Lee JY, Wang DIC, Ting YP (2007) Identification of active biomolecules in the high-yield synthesis of single-crystalline gold nanoplates in algal solutions. *Small* 3:672–682
- Yang YT, Chen IT, Lee CT, Chen CY, Lin SS, Hor LI, Tseng TC, Huang YT, Sritunyalucksana K, Thitamadee S, Wang HC, Lo CF (2014) Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc* 2:e00816–e00814
- Yousefzadi M, Rahimi Z, Ghafari V (2014) The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (Wulfen). *J Agardh Mater Lett* 137:1–4
- Zhao G, Stevens SE (1998) Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *BioMetals* 11:27–32

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Certificado de acuse de
recibo registro(s):
MX/2015/014941

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCION DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES AREAS
BIOTECNOLOGICA, FARMACEUTICA Y QUIMICA
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO AREA
BIOTECNOLOGICA
Expediente de Patente **MX/a/2015/002621**

Asunto: Se informa 1er requisito de fondo.

Ciudad de México, a 14 de enero de 2020.

RICARDO ALBERTO GOMEZ FLORES

No. Folio: **2361**

Apoderado de

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Av. Lázaro Cárdenas No. 4600 Ote. entre Praga y Trieste, Centro de Incubación de Empresas y Transferencia de Tecnología (CIETT), Unidad Mederos

C.P. 64930, MONTERREY, Nuevo León, México

REF: Su solicitud No. MX/a/2015/002621 de Patente presentada el 27 de febrero de 2015.

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en los artículos 53 de la Ley de la Propiedad Industrial (LPI) y 42 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial (RLPI), se le comunica lo siguiente:

El examen fue realizado en base a los siguientes documentos de la solicitud:

Descripción: páginas 1 a 16, como originalmente fueron presentadas.

Reivindicaciones: No.1 a 6, como originalmente fueron presentadas.

Figuras: No. 1 a 14, como originalmente fueron presentadas.

Se le comunica al solicitante que se han tomado en cuenta los documentos de la solicitud arriba indicados y que derivado del análisis realizado a los mismos indicados se procede a exponer lo siguiente:

1. Respecto a la materia técnica reivindicada.

Reivindicaciones 1 a 14: Un método de preparación de coloides estables de nanopartículas ultrafinas de plata y partículas policristalinas de Ag/AgCl utilizando extracto de alga del género *Ulva* caracterizado porque se comprende de las etapas de: a) Obtención del extracto liofilizado de algas del género *Ulva*, b) Obtención del extracto diluido en agua y alcohol, c) Síntesis de nanoestructuras en el extracto diluido de algas del género *Ulva*, d) Purificación de nanoestructuras.



MX/2020/2361



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
otorga el

PREMIO UANL A LA INVENCIÓN
RECONOCIMIENTO A LA PROPIEDAD INTELECTUAL 2014

a

Dr. Carlos Luna Criado
Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez
Dra. Raquel Mendoza Reséndez
Dr. Denis Regis Michel Ricque Marie
Sr. César Jaime González Dueñas
Lic. Maribel Maldonado Muñiz

Con la invención titulada: "Método de preparación de coloides estables de nanopartículas ultrafinas de plata y partículas policristalinas de Ag/AgCl utilizando extractos de algas del género *Ulva*", con solicitud de registro de Patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial: MX/a/2015/002621.

"ALERE FLAMMAM VERITATIS"
Monterrey, Nuevo León, 19 de mayo de 2015



DR. JESÚS ANCER RODRÍGUEZ
Rector





Indo-Mexican Conference

on

Developments in Aquaculture Nutrition and Disease Management

9th & 10th August, 2019

Organized by: Department of Microbiology

Sponsored by: Pondicherry University

Certificate

This is to certify that Prof./Dr./Mr./Ms. Q. F. B. Maribel Maldonado Muñiz Participated/

Presented a Poster/Chaired a session/Delivered invited Lecture in the Indo-Mexican Conference on "Developments in

Aquaculture Nutrition and Disease Management" held during 9th & 10th August, 2019

Prof. P.P. Mathur
Dean, School of Life Sciences

Dr. J. Selvin
Professor and Coordinator
Department of Microbiology



SE OTORGA EL PRESENTE RECONOCIMIENTO

A: Maribel Maldonado*, Martha G. Nieto López, Lucía Elizabeth Cruz
Suárez

Mérida, Yucatán, México
Noviembre 13-15, 2019

POR LA PRESENTACIÓN ORAL:

Nanopartículas de plata como aditivo en alimentos para el control de enfermedades
causadas por *Vibrio* en camarón blanco *Litopenaus vannamei*

En el XV Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, llevado a cabo del 13 al 15 de noviembre de 2019
en Mérida, Yucatán

Dra. Gabriela Gaxiola Cortés
Facultad de Ciencias UNAM - Comité Organizador SINA 2019



UADY
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN





REVISIONES EN NUTRICIÓN DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

Editores: Lucía Elizabeth Cruz
Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya
Tapia Salazar, Martha Guadalupe
Nieto López, David A. Villarreal
Cavazos, Julián Gamboa Delgado,
Martha Gabriela Gaxiola Cortés y
Miguel Ángel Olvera Novoa.

Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos
2019, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Miguel Ángel Olvera Novoa

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2019

Copias disponibles en:
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Maricultura
Cd. Universitaria A.P. F-67
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66455
Tel.+Fax. 818352 6380
E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

Autores del escrito. 2019. Nombre del artículo. Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Miguel Ángel Olvera Novoa. Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. ISBN: 978-607-27-1268-3. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias
- Y a la imprenta Universitaria de la UANL por el apoyo brindado para la impresión de estas memorias.

Índice

<p>Rocío Guerrero Zarate*, Carlos A. Álvarez-Gonzalez, Ronald Jesús-Contreras, Raúl Llera-Herrera, Otilio Méndez Marín, Mario A. Galaviz, Lus M. López</p> <p>Uso de carbohidratos en alimentos para pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>) y su efecto en el metabolismo intermediario</p> <p>Use of carbohydrates in foods for pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>) and its effect on intermediary metabolism</p>	1
<p>Uriel Rodríguez Estrada*, Carlos A. Álvarez González, Emyr Peña-Marín, Susana Camarillo-Coop, Rafael Martínez García</p> <p>Avances en la investigación a nivel mundial en alimentos alternativos basados en proteínas para la cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)</p> <p>Worldwide Research Advances in Alternate Protein-Based Feedstuffs for Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)</p>	38
<p>Diana Cristina Corral Rosales*, Elena Palacios, Denis Ricque, L.Elizabeth Cruz Suárez</p> <p>Efectos de la inclusión dietaria de <i>Ulva clathrata</i> sobre el desempeño reproductivo y la calidad del desove en camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931) en condiciones de producción comercial</p> <p>Effects of the dietary inclusion of <i>Ulva clathrata</i> on reproductive performance and spawning quality in white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931) under commercial production conditions</p>	72
<p>Tsai García Galano*, Olimpia Carrillo, Laida Ramos y Gabriela Gaxiola</p> <p>Efecto de la vitamina C en los camarones peneidos: estado actual del conocimiento</p> <p>Vitamin C and his effect on shrimp: current stage of knowledge</p>	106
<p>Martín Arenas*, Álvaro Barreto y Gabriela Gaxiola</p> <p>Estado actual del desarrollo acuícola, la alimentación y la nutrición de los Centropómidos</p> <p>Current status of aquaculture development, food and nutrition of Centropomids</p>	132
<p>Adriana Ferreira Da Silva*, Adriana Carolina Carrillo P at, Juan Carlos Maldonado Flores, Magnolia Tzec Gamboa, Francisco J. Solorio Sánchez</p> <p>Enfoque sustentable en la engorda de tilapia del Nilo alimentadas con harina de biofloc: una revisión</p> <p>Sustainable approach of grow Nile tilapia fed with biofloc meal: a review</p>	150
<p>Maribel Maldonado-Muñiz, Nieto-López Martha Guadalupe, Lucia Elizabeth Cruz-Suárez</p> <p>Nanopartículas de Plata como Aditivo en Alimentos para Control de Enfermedades Causadas por <i>Vibrio</i> en <i>L. vannamei</i></p>	168

Nanopartículas de plata como aditivo en alimentos para control de enfermedades causadas por *Vibrio* en *L. vannamei*

Maribel Maldonado-Muñiz, Nieto-López Martha Guadalupe, Lucia Elizabeth Cruz-Suárez
Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Ciencias Biológicas (FCB),
Programa Maricultura. Av. Universidad S/N, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66455,
México. Tel/Fax: +52 81 8352-6380

e-mail: maribel.maldonadomn@uanl.edu.mx; lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

RESUMEN

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son conocidas por sus ya demostradas actividades antibacterianas, antivirales, y antifúngicas. Esto, ha provocado un aumento sobre su investigación y posible aplicación como agente terapéutico en el sector acuícola con la finalidad de minimizar las pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades emergentes. Sin embargo, hoy en día los estudios realizados sobre este tema en camarón son incipientes. Durante los últimos 5 años nuestro grupo de investigación ha evaluado la efectividad de nanopartículas de plata, sintetizadas a base de extractos de algas marinas mexicanas, como agente antimicrobiano suplementado en dietas para el control de la *Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)* producida por cepas de *Vibrio parahaemolyticus*. En este trabajo se presenta una revisión de las investigaciones sobre el uso de AgNPs en dietas para camarón incluyendo los avances generados por nuestro grupo en cuanto a: 1) síntesis, 2) evaluación *in vitro*, 3) estandarización de la inclusión de AgNPs en dietas peletizadas y evaluación de su estabilidad, y 4) Efecto del consumo de estos alimentos en: sobrevivencia de camarones desafiados, microbioma fecal, histología, toxicidad, bioacumulación y depuración en diferentes tejidos.

Palabras clave: Nanopartículas, macroalgas, camarón, anti-*Vibrio*



XIII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA



UES

Universidad Estatal de Sonora
Valer, Inteligencia y Determinación

La Universidad Estatal de Sonora

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

Maribel Maldonado-Muñiz, Denisse Gonzalez-Colunga, Mayra Meléndez-Villanueva, Zulema Ríos-Sánchez, Sonia Soto-Rodríguez, Bruno Gomez-Gil, Denis Ricque-Marie y Lucía Elizabeth Cruz-Suárez

Por su participación con el cartel:

Nanopartículas metálicas una alternativa contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de ahpn en camarón blanco *L. vannamei*

Hermosillo, Sonora, 11, 12 y 13 de Noviembre de 2015.

Mtro. Horacio Huerta Cavallas
RECTOR
UNIVERSIDAD ESTATAL DE SONORA

Dra. Martha Elisa Rivas Vega
Presidenta
Comité Organizador XIII SINA



XIII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA



UES

Universidad Estatal de Sonora
Valor, Inteligencia y Determinación

La Universidad Estatal de Sonora

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

**Maribel Maldonado-Muñiz, Misael Martínez-Cruz, Gabriela Pérez-
Martínez, Denis Ricque-Marie y Lucia Elizabeth Cruz-Suárez**

Por su participación con el cartel:

**Evaluación de nanopartículas contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de
AHPND Y su citotoxicidad en Artemia salina**

Mtro. Horacio Huerta Cevallos
RECTOR
UNIVERSIDAD ESTATAL DE SONORA

Hermosillo, Sonora. 11, 12 y 13 de Noviembre de 2015.

Dra. Martha Elisa Rivas Vega
Presidenta
Comité Organizador XIII SINA

Evaluación de nanopartículas contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND y su toxicidad en *Artemia salina*

Maribel Maldonado-Muñiz, Misael Martínez-Cruz*, Gabriela Pérez-Martínez*, Denis Ricque-Marie, Lucía Elizabeth Cruz-Suárez
Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Cd. Universitaria, CP. 66455
maribelmaldon60@hotmail.com; lucia.cruzsr@uanl.edu.mx,
Palabras clave: Nanopartículas, *Vibrio*, *Artemia*.

INTRODUCCIÓN

Una de las problemáticas más recientes en el cultivo de camarón son las mortalidades causadas por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (VP) causantes de Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND). Hoy en día el uso desmedido de antibióticos para contrarrestar esta y otras enfermedades de carácter bacteriano ha causado cambios en las comunidades bacterianas, las cuales a su vez han desarrollado resistencia a estos compuestos haciendo cada vez más difícil su tratamiento. Las nanopartículas (NP) representan una alternativa por su actividad antimicrobiana, pero su toxicidad en organismos acuáticos ha sido poco estudiada. En este trabajo se compararon dos técnicas para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de (NP) contra VP causante de AHPND, adicionalmente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y además se analizó su toxicidad en *Artemia salina* y su dosis letal media (DL₅₀).

METODOLOGÍA

Producción de NP: se realizó según la metodología propuesta en patente No. MX/2015/014941UANL.

Evaluación de la actividad antibacteriana: Las NP fueron evaluadas contra una cepa de VP (M0904) causante de AHPND clasificada como de alta patogenicidad (Soto-Rodríguez et al. 2015) mediante antibiogramas en sensidiscos y en doble capa en agar Mueller Hinton.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): fue determinada mediante microdilución en placa (Sarker et al. 2007).

Evaluación de la toxicidad en *Artemia*: fue realizada en microplaca utilizando 10 nauplios de *Artemia salina* según la metodología de Arulvasu et al. (2014), cada dosis fue evaluada por triplicado y se determinó la dosis letal media mediante regresión lineal.

Análisis estadístico: se utilizó T-student para comparar la técnica de sensidisco vs doble capa de los antibiogramas.

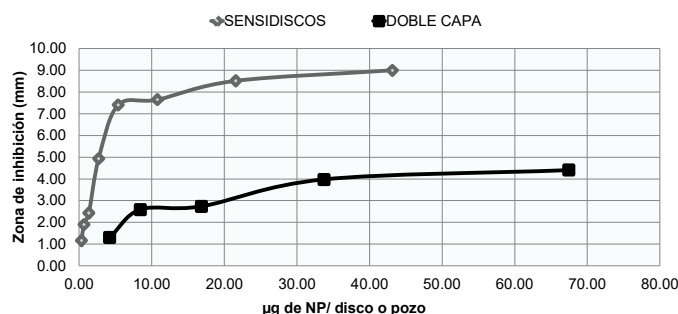


Figura 1. Diámetro promedio (n=3) de halos de inhibición generados por diferentes concentraciones de NP mediante las técnicas de sensidisco y doble capa (p=0.0001).

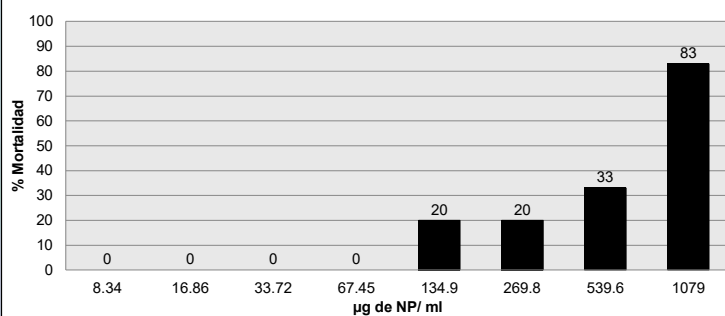


Figura 2. Mortalidad (%) de nauplios de *Artemia salina* a diferentes concentraciones de NP en 24 h.

CONCLUSIONES

La técnica de difusión en disco fue más sensible que la técnica de doble capa. La DL₅₀ de NP en nauplios de *Artemia* es 10 veces mayor que la CMI.

Las NP son un agente antimicrobiano de baja toxicidad en *Artemia* con gran potencial como aditivo en alimentos peletizados para camarón contra infecciones del tipo bacteriano como VP. Actualmente se está evaluando la acción de las NP en camarones infectados con diferentes *Vibrios* patógenos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron halos de inhibición de 8.99 ± 0.13 y 4.40 ± 0.25 mm para una concentración de 43.2 y 67.4 µg en metodologías de sensidisco y doble capa respectivamente, por lo cual la técnica de sensidisco resultó ser más sensible para evaluación de NP (ver Figura 1). En la evaluación con microdilución en placa se obtuvo una CMI de 67.4 µg de NP/ml. Mientras que para la evaluación de toxicidad en *Artemia salina* se obtuvo una DL₅₀ de 676 µg de NP (ver Figura 2).

Proyecto financiado por CONACYT Ciencia Básica
clave: 238458

Referencias:

- Arulvasu, C. et al., 2014. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *Artemia*. *The ScientificWorldJournal*, 2014, p.256919.
- Sarker, S.D., Nahar, L. & Kumarasamy, Y., 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods (San Diego, Calif.)*, 42(4), pp.321–4.
- Soto-Rodríguez, S. et al., 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), pp.1689–1699.



NANOPARTICULAS UNA ALTERNATIVA CONTRA *Vibrio parahaemolyticus* CAUSANTE DE AHPND EN CAMARON BLANCO *L. vannamei*



Maribel Maldonado-Muñiz¹, Denisse Gonzalez-Colunga¹, Mayra Meléndez-Villanueva¹, Zulema Ríos-Sánchez¹, Sonia Soto-Rodríguez², Bruno Gomez-Gil², Denis Ricque-Marie¹, Lucía Elizabeth Cruz-Suárez¹

¹Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, ²Centro de Investigación Alimentos y Desarrollo (CIAD-Mazatlán), Cd. Universitaria CP. 66455,

maribelmaldon60@hotmail.com; lucia.cruzs@uanl.edu.mx

Palabras clave: Nanopartículas, *Vibrio parahaemolyticus*, camarón

INTRODUCCIÓN

Actualmente una de las principales causas de mortalidad en el cultivo de camarón es la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND por sus siglas en inglés) causada por algunas cepas tóxicas de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp), generando grandes pérdidas económicas. Las nanopartículas (NP) generadas por química verde presentan una alternativa por su actividad antimicrobiana y la baja posibilidad de generar resistencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* e *in vivo* nanopartículas desarrolladas por investigadores de la UANL, contra tres cepas de Vp causantes de AHPND (VpAHPND⁺)

METODOLOGÍA

Evaluación *In vitro*

Fabricación de NP

- Las NP fueron producidas según la metodología de la patente No. MX/E/2015/014941 UANL

Actividad antibacteriana

- Se determinó el efecto antibacteriano *in vitro* de las NP (48 µg/disco) contra dos cepas de Vp AHPND⁺ (M0506, M0904) de alta patogenicidad y una inocua (M0528) (Soto-Rodríguez *et al.* 2015) mediante técnica de difusión en disco (Selvin *et al.* 2009)

Evaluación *In vivo*

8 camarones de 1 g aprox. (*L. vannamei*) fueron mantenidos en acuarios de 30 L por triplicado de agua marina

Se alimentaron durante dos días con una dieta control 0 µg de NP/gr y una dieta experimental con 86 µg de NP/gr de alimento

Se colectaron hepatopáncreas (HP), intestino (IN) y estómago (ES) de camarones moribundos a las 14, 20, 37 y 42 hrs post-infección

Posteriormente fueron desafiados con un inóculo de la cepa M0904 (1.5 x 10⁵ UFC/mL)

Se tomó una alícuota de 100 µl con dilución 10⁻³ y se sembró en medio TCBS y CHROMagar *Vibrio*



RESULTADOS

Las NP (48 µg/disco) produjeron halos de inhibición de 5.3, 6.4 y 5.4 mm para las cepas, M0528, M0506, M0904 respectivamente (valores obtenidos restando diámetro de sensidisco de 6mm). El consumo de alimento con NP disminuyó la carga bacteriana de vibrios (colonias verdes y amarillas en TCBS) y de Vp (colonias malva en CHROMagar) en camarones infectados desde las 14h p.i. en HP, las 37h p.i. en ES y 42h p.i. en IN.

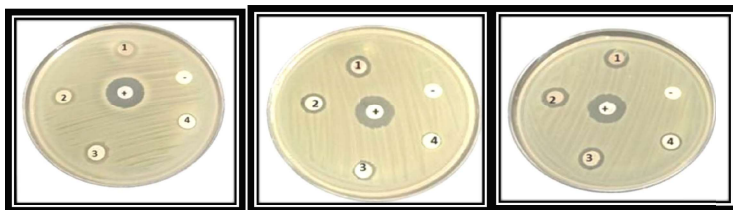


Tabla 1. Efecto del consumo de alimentos con NP sobre la carga VP en órganos de camarones infectados con M0904 (medio TCBS y en CHROMagar) a diferentes tiempos pos-infección

Tratamiento	14 hr			20 hr			37 hr			42 hr		
	HP	IN	ES	HP	IN	ES	HP	IN	ES	HP	IN	ES
Sin NP	+++	+++	+++	++	++	++	+	++	+	+	+	+
Con NP	-	++	++	-	++	+	-	+	-	-	-	-

CONCLUSIÓN

Las NP evaluadas en presente estudio son un agente antimicrobiano eficaz con gran potencial como aditivo en alimentos peletizados para contrarrestar Vp AHPND⁺. Actualmente el efecto en la sobrevivencia de camarones infectados y el cambio en el microbioma del tracto digestivo por metagenómica del 16S ribosomal (V3) están siendo evaluados.

Referencias:

- Selvin, J., Shanmugapriya, S. & Gandhimathi, R., 2009. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(3), 435–445.
- Soto-Rodríguez, S. A. *et al.*, 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), pp.1689–1699.



Proyecto financiado por CONACYT
Ciencia Básica clave: 238458



Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias Marinas



XIV Simposio Internacional de Nutrición Acuicola.
XIV International Symposium on Aquaculture Nutrition.

Otorga el presente

Reconocimiento

A:

Maribel Maldonado Muñoz

Universidad Autónoma de Nuevo León-Posgrado

Por haber obtenido el 1er LUGAR, con su valiosa participación de la Ponencia:
"EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE ALIMENTOS PELETIZADOS PARA CAMARÓN ADICIONADOS CON
NANOPARTÍCULAS EN *L. vannamei*"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
MARINAS

Ensenada, B.C. a 6 de octubre de 2017.
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

VICERRECTORIA
ENSENADA, B.C.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA

Lus Mercedes López Acuña
DRA. LUS MERCEDES LÓPEZ ACUÑA
PRESIDENTA, COMITÉ ORGANIZADOR SINA

Blanca Rosa García Rivera
DRA. BLANCA ROSA GARCÍA RIVERA
VICERRECTORA UABC, CAMPUS ENSENADA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

Otorgan la presente

constancia
a:

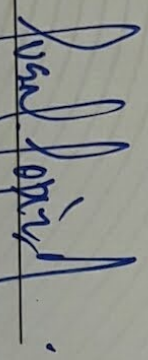
*Maldonado-Mariz Maribel, Nieto-López Martha, Tapia-Sabazar Mirreya, Rique-
Marie Denis, Soto-Rodriguez Sonia, Lozano-Olvera Rodolfo, Cruz-Saiz-Lucia E.*


POR SU PARTICIPACIÓN EN LA PONENCIA

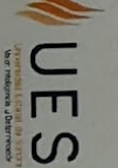
"Evaluación toxicológica de alimentos peletizados para camarón adicionados con nanopartículas en

L. vannamei"

Ensenada Baja California, México, a 6 de octubre 2017.


Dra. Lus Mercedes López Acuña
Presidente
Comité Organizador XIV SINA


Dra. Blanca Rosa García Rivera
Vicerrectora
Universidad Autónoma de Baja California,
Campus Ensenada





EVALUACION TOXICOLÓGICA DE ALIMENTOS PELETIZADOS PARA CAMARÓN ADICIONADOS CON NANOPARTÍCULAS EN *L. vannamei*.

Maldonado-Muñiz Maribel¹, Nieto-López Martha¹, Tapia-Salazar Mireya¹, Ricque-Marie Denis¹, Soto-Rodríguez Sonia², Lozano-Olvera Rodolfo², Cruz-Suárez Lucia Elizabeth¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd. Universitaria, CP. 66455;

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Mazatlán.

maribelmaldonado60@hotmail.com; lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Palabras clave: Nanopartículas; *Vibrio*; Toxicidad.



INTRODUCCIÓN

Una de las problemáticas más recientes en el cultivo de camarón es la mortalidad causada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) responsables de la *Enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas* (AHPND)¹.

Las nanopartículas metálicas (NPs) debido a sus características físico-químicas (tamaño, forma, superficie, etc) y por su actividad antibacteriana representan una alternativa para el control de este tipo de enfermedades. A la fecha no existe información sobre la toxicidad de AgNPs en camarón; es por esto que el objetivo de este trabajo fue evaluar la inocuidad de alimentos peletizados adicionados con concentraciones nominales de NPs de plata (AgNPs) sintetizadas con un extracto acuoso del alga *Ulva*, y su efecto en sobrevivencia, crecimiento, índice hepatosomático e histología en juveniles de *L. vannamei*.

METODOLOGÍA

Bioensayo sobrevivencia (BS)

4 replicados por dieta
12 organismos por acuario
(0.87 ± 0.08 g peso promedio inicial)

Bioensayo histología (BH)

4 replicados por dieta
22 organismos por acuario
(1.2 ± 0.14 g peso promedio inicial)

Dietas adicionadas con 0, 10, 100 y 1 000 mg de AgNPs kg⁻¹ (ppm) de alimento (D1, D2, D3 y D4 respectivamente).

Alimentación con 5% de la biomasa durante 20 días

Acuarios de 10 L, sistema cerrado, recambio diario del 100%, aireación individual.

Parámetros evaluados

- ✓ Consumo de alimento y comportamiento diario
- ✓ Sobrevivencia acumulada (%SA)
- ✓ Tasa de crecimiento (%TC)

Parámetros evaluados

Se disectó el HP de 3 camarones por acuario los días 0, 5, 10 y 20 para evaluar:

- ✓ Índice hepatosomático (IHP)
- ✓ Histología (los HP se conservaron en solución Davidson y realizó una tinción de H&E^{2,3})

Análisis estadístico

- ✓ ANOVA y post hoc de Tukey para SA y TC (p ≤ 0.05).
- ✓ ANOVA y post hoc de Dunnett para IHP,
- ✓ Riesgo relativo (RR) convirtiendo la prevalencia de las observaciones histológicas en datos dicotómicos (p ≤ 0.05) SigmaPlot 11.0.

Referencias:

1. Soto-Rodríguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M. & Morales-Covarrubias, M. S.. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1689–99 (2015).
2. Bilberg, K., Hovgaard, M. B., Besenbacher, F. & Baatrup, E. *J. Toxicol.* 2012, 9 (2012).
3. Scown, T. M. *et al. Toxicol. Sci.* 115, 521–534 (2010).
4. Zhao, C.-M., & Wang, W.-X. (2011). *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 30(4), 885–92.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el BS los organismos de los tratamientos con AgNP no presentaron diferencias en el consumo de alimento con respecto al tratamiento de 0 ppm. En los días 5, 10 y 15 los camarones de la dieta D1 mostraron un mayor número de cromatóforos expandidos y síntomas de estrés en comparación con el resto de los tratamientos (figura 1). No se observaron diferencias significativas en %SA y %TC (grafica 1).

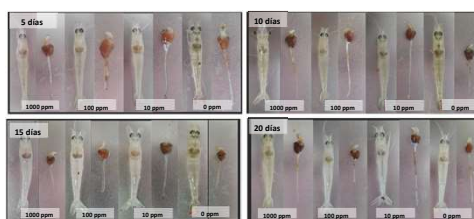


Figura 1. Camarones y tracto digestivo de los camarones a los días 5, 10, 15 y 20 de alimentación con dietas suplementadas con AgNP.

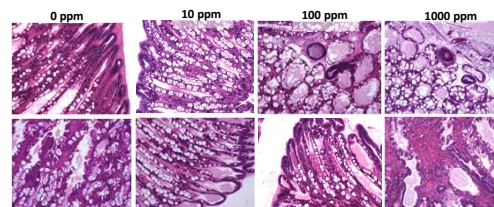
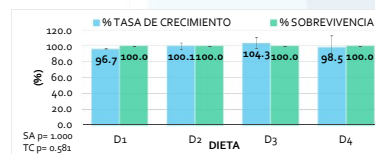


Figura 2. Microfotografía de HP de camarón *L. vannamei* después de 20 de alimentación con dietas suplementadas con AgNP.

Estudios de toxicidad *in vivo* en peces han mostrado evidencia de toxicidad de AgNP en dosis de exposición en agua dulce mayores a 50 mg/L en pez zebra² y 100 mg/L en trucha arcoíris³. Sin embargo, la diversidad en los resultados de toxicidad reportados para diferentes organismos por exposición a las AgNPs es atribuido a diferentes factores ambientales (pH, salinidad), vía de exposición (agua, alimento), y características físicas que afectan la biodisponibilidad (liberación de iones, tamaño, forma, carga, recubrimiento, solubilidad)⁴.

Grafica 1. Tasa de crecimiento y sobrevivencia obtenidos durante el BS.



El IPH no mostró diferencias significativas (P= 0.089). El análisis histológico, mostró que al inicio (0 días) los organismos presentaron un buen estado de salud, con estructuras tubulares normales y ligera disminución de vacuolas en las células R y B, lo cual es un indicativo de daño leve en el HP (atribuido al estrés de transportación). Después de 20 días de alimentación, se observó que los camarones alimentados con la D2 mostraron una mejora significativa (RR 0.111, p < 0.001) al reducirse la cantidad de células picnóticas en comparación con los demás tratamientos; mientras que el tratamiento D4, mostró un daño significativo (RR 4.5, p < 0.002) debido al aumento de lesiones necróticas severas y desorganización de las estructuras tubulares (figura 2).

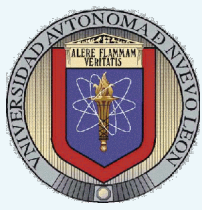
CONCLUSIONES

- ✓ El consumo por 20 días de dietas adicionadas con AgNPs sintetizadas a base de extracto de *Ulva clathrata* a una concentración nominal de 10, 100 y 1000 ppm en las condiciones evaluadas, no afectó la sobrevivencia, el crecimiento y el índice hepatosomático del camarón *L. vannamei*.
- ✓ La dosis de 1000 ppm ocasionó daños histológicos significativos en el HP por lo que el posible uso de éstas NPs debe restringirse a dosis entre 10 y 100 ppm.

AGRADECIMIENTOS

Muñiz-Medrano S. por el apoyo y soporte técnico recibido durante la realización de este trabajo. Proyecto financiado por CONACYT Ciencia Básica. Clave: 238458





A GREEN NANOTECHNOLOGY APPROACH TO MANAGE THE ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE (AHPND) IN CULTIVATED SHRIMP

M. Maldonado-Muñiz¹, C. Luna², R. Mendoza-Resendez², S. Soto-Rodriguez³,
D. Ricque-Marie¹, L.E. Cruz-Suarez^{1*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Físico Matemáticas
Cd. Universitaria, CP. 66455, San Nicolás de los Garza Nuevo León, Mexico.

³Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental
maribel.maldonadomn@uanl.edu.mx; lucia.cruzsr@uanl.edu.mx



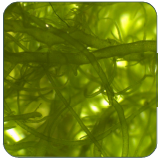
INTRODUCTION

Bacterial diseases caused by *Vibrio* species have been reported as the cause of the most serious economic losses worldwide in shrimp aquaculture. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), also referred to as Early Mortality Syndrome (EMS) is caused by some pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND+}) and has caused mortalities from 40 to 100 % in the first 35 days of the grow-out phase in shrimp farms. One of the most promising antibacterial therapeutic alternative is the nanotechnology and the use of algae-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles (NPs) because of antimicrobial activity and low risk to generate resistance. Various types of algae have been extensively explored as a potential tool for green synthesis of metallic nanoparticles with antimicrobial applications against different bacteria. This is the first study where silver and silver chloride nanoparticles (Ag/AgCl NPs) biosynthesized with an aqueous extract of cultivated *Ulva clathrata* (AEU) have been evaluated *in vitro* against shrimp pathogenic strains of Vp_{AHPND+}.

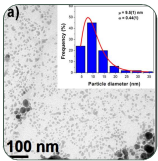
OBJECTIVE

To evaluate *in vitro* antibacterial activity of Ag/AgCl NPs of *Ulva* mediated synthesis, AgNO₃ and AEU against three strains of *Vibrio parahaemolyticus* and the acute toxicity of this products on *Artemia sp.*

METHODOLOGY

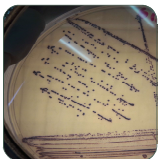


The seaweed *Ulva* was cultivated on a large scale system with shrimp co-culture in San Quintin, Baja California, Mexico, and was processed for drying and grinding according Peña-Rodríguez *et al.* 2011.



The products evaluated were:

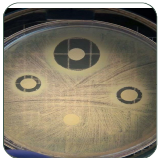
- ✓ Aqueous extract of *Ulva* (AEU)
- ✓ Ag/AgCl NPs (10-50 nm) synthesized with AEU according to Patent MX/ E/2015/014941 IMPI
- ✓ Silver nitrate solution (AgNO₃)
- ✓ Enrofloxacin as a positive control (30 µg/mL)



Strains of Vp

- ✓ AHPND⁺ M0904 and M0605
- ✓ AHPND⁻ M0528

Vibrio strains were isolated from AHPND infected shrimp by the CIAD Mazatlan (Soto *et al.* 2015). The strains were kept cryopreserved (-80 °C) until activated in TSB 2.5% NaCl.



Antibacterial activity

- ✓ Disk diffusion method Kirby-Bauer measuring the inhibition zone diameter. Statistical analyses: Anova and Tukey test (p<0.05), Statistica 8.0.
- ✓ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) according to Sharkar *et al.* 2007.



Artemia sp. toxicity

The acute toxicity was determined according to Solis *et al.* 1993, measuring the % Mortality on brine shrimp *Artemia sp.* (INVE, Group) exposed to various concentrations of AEU, Ag/AgCl NPs and AgNO₃ and calculate the LD₅₀ by lineal regression.

RESULTS

Table 1. *In vitro* antimicrobial activity by microdilution assay
MIC values as µg of Ag⁺/mL

Strain of Vp.	AEU	AgNO ₃	Ag/AgCl NPs
M0528	NI	11.9	23.8
M0605	NI	11.9	11.9
M0904	NI	11.9	8

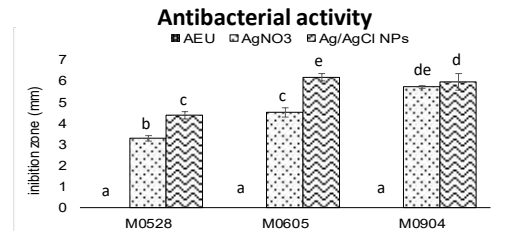


Figure 1. Average inhibition zone diameter (mm) ± SD (n=3) observed with diffusion method Kirby-Bauer tested at same concentration 380 µg of Ag⁺/mL or 7.6 µg per disc of Ag/AgCl NP and AgNO₃. AEU did not show inhibition. The diameter of the paper disc is not included (6mm). Different letters (a-e) represents significant difference (p<0.05).

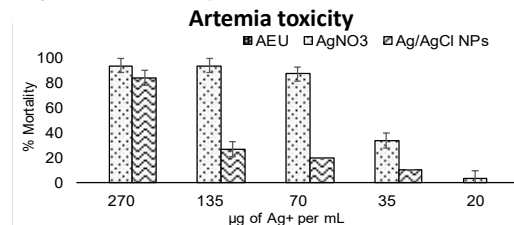


Figure 2. % Mortality on brine shrimp *Artemia sp.* ± SD. LD₅₀ was 168.7 and 48.0 µg of Ag⁺/mL for AgNO₃ and Ag/AgCl NP respectively, AEU did not show mortality.

CONCLUSIONS

- ✓ The Ag/AgCl NPs synthesized with AEU and AgNO₃ exhibit an important antimicrobial effect against Vp pathogen strains.
- ✓ The Ag/AgCl NPs LD₅₀ in brine shrimp *Artemia sp.* was ten times larger than the MIC. The Ag/AgCl NPs, were less toxic than AgNO₃.
- ✓ The M0528 strain present greatest susceptibility to the evaluated products.

FUTURE DIRECTIONS

- ✓ The Ag/AgCl NPs synthesized with *Ulva clathrata* aqueous extract are a potential therapeutic additive to manage of the AHPND.
- ✓ The evaluation of Ag/AgCl NPs as a dietary therapeutic additive and its toxicological effect in shrimp are under study.

Referencias:

- Peña-Rodríguez, Alberto, Thomas P. Mawhinney, Denis Ricque-Marie, and L. Elizabeth Cruz-Suárez. 2011. Food Chem. 2011.04.104.
- Sarker, Satyajit D, Lutfun Nahar, and Yashodharan Kumarasamy. 2007. Methods (San Diego, Calif.) 42 (5).
- Solis, Pablo, Colin Wright, Margaret Anderson, Mahabir Gupta, and J. Phillipson. 1993. Planta Medica 59 (03).
- Soto-Rodriguez, Sonia a., Bruno Gomez-Gil, Rodolfo Lozano-Olvera, Miguel Betancourt-Lozano, and Maria Soledad Morales-Covarrubias. 2015. Applied and Environmental Microbiology 81 (5).

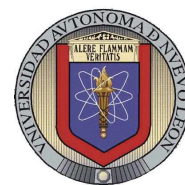
Acknowledgments:

This project was funded by CONACYT Ciencia Basica 238458



Ulva clathrata silver nanoparticles, a potential approach to manage bacterial diseases in shrimp: toxicity, bioaccumulation and depuration

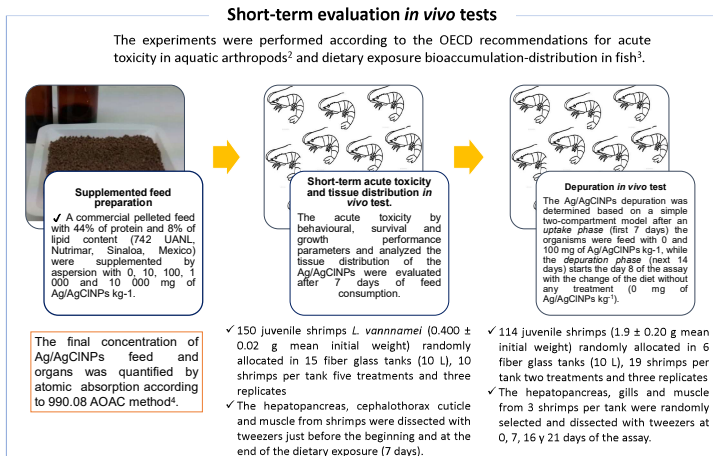
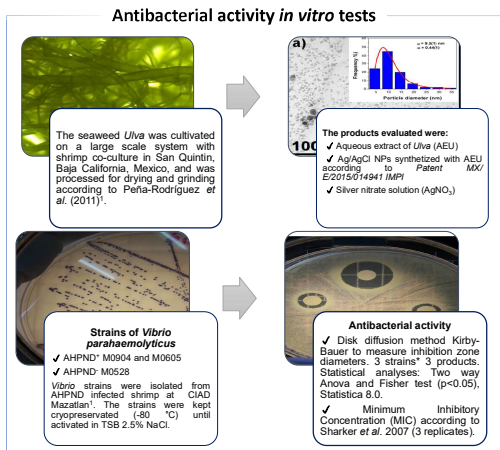
Maribel Maldonado-Muñiz¹, Carlos Luna², Raquel Mendoza-Resendez², E. D. Barriga-Castro³, Sonia Soto-Rodriguez⁴,
¹Denis Ricque-Marie¹, Lucia Elizabeth Cruz-Suarez¹
¹Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Ciencias Biológicas, México.
²UANL, Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, México, ³Centro de Investigación en Química Aplicada, México, ⁴Centro de Investigación Alimentación y Desarrollo, México.
Email: denisricque@hotmail.com; lucia.cruzsr@uanl.edu.mx,
Keywords: Green nanotechnology; Green macroalgae; Toxicity in shrimp



INTRODUCTION

Bacterial diseases caused by *Vibrio* species have been reported as the cause of the most serious economic losses worldwide in shrimp aquaculture. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), also referred to as Early Mortality Syndrome (EMS) is caused by some pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}) and has caused mortalities from 40 to 100 % in the first 35 days of the grow-out phase in shrimp farms. One of the most promising antibacterial therapeutic alternative is the nanotechnology and the use of algae-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles (NPs) due to their antimicrobial activity and low risk to generate resistance. Various types of algae have been extensively explored as potential tools for the green synthesis of metallic nanoparticles having antimicrobial applications against different bacteria. This is the first study where silver and silver chloride nanoparticles (Ag/AgCl NPs) biosynthesized with an aqueous extract of cultivated *Ulva clathrata* (AEU) have been evaluated *in vitro* against shrimp pathogenic strains of Vp_{AHPND}. The objective of our study is to provide valuable information as a basis for the use of new generation antibacterial products manufactured with nanotechnology and demonstrate *Ulva* Ag/AgCl NPs safety at appropriate doses.

METHODOLOGY



RESULTS

Ag-based NPs with nanometric sizes were successfully produced by a green synthesis using an aqueous extract from cultivated seaweed *Ulva clathrata* as reducing and stabilizing agents. The biosynthesized AgNPs were spherical to polymorphic shape, with an average size of 9.5 nm, the microstructural and compositional studies revealed that these particles contained crystallites of fcc phases of metallic Ag and AgCl, and the presence of organic of molecules from the seaweed extract like proteins, polysaccharides and polyphenols which are responsible for the formation of Ag/AgCl NPs and their stabilization. The biosynthesized Ag/AgCl NPs exhibited an important *in vitro* antibacterial effect against three Vp strains isolated from shrimps from farms affected with AHPND in north-western Mexico.

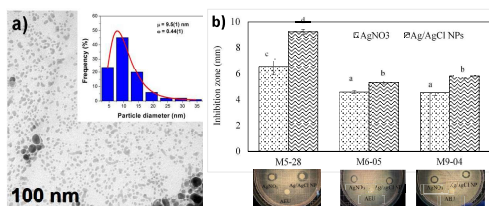


Figure 1. a) Representative TEM image of Ag/AgCl NPs synthesized using *Ulva* aqueous extract. The insert image shows the related size distribution. Solid red line corresponds to the best log-normal distribution fit. b) Average inhibition zone diameters (mm) ± SD (n=3) observed with diffusion method tested at similar concentrations (10 µg Ag per disc for Ag/AgCl NPs or AgNO₃). The diameter of the paper disc is not included (6mm). Different letters (a-e) represent significant differences according to a Fisher post-hoc multiple mean comparison test among the 6 treatments.

Table 1. *In vitro* antimicrobial activity of NPs vs AgNO₃ solutions as evidenced by microdilution assays

Strain of Vp.	Ag/AgCl NPs		AgNO ₃	
	MIC µg mL ⁻¹	MBC µg mL ⁻¹	MIC µg mL ⁻¹	MBC µg mL ⁻¹
M5-28	3.2	6.3	1.6	3.2
M6-05	3.2	6.3	1.6	3.2
M9-04	3.2	6.3	3.2	6.3

Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC).

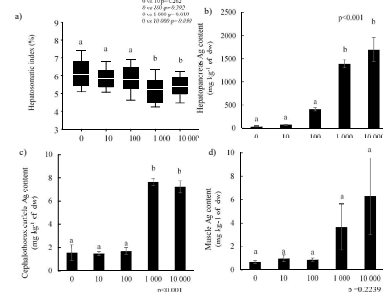
In both bioassays conducted, the supplemented feed consumption for 7 days at the different doses evaluated did not affect the behavioral and survival. During the *first in vivo* test the consumption of supplemented feed at low doses (10 and 100 ppm), a positive tendency was found on the growth rate (%).

Table 2. Growth performance parameters

Parameters	Experimental diets (mg of Ag/AgClNPs kg ⁻¹ of feed)					P value
	0	10	100	1 000	10 000	
Shrimp weight						
Mean initial body weight (g)	0.441 ± 0.012 ^a	0.444 ± 0.005 ^a	0.438 ± 0.002 ^a	0.438 ± 0.009 ^a	0.440 ± 0.002 ^a	0.8509
Mean final body weight (g)	0.512 ± 0.010 ^a	0.540 ± 0.005 ^a	0.533 ± 0.012 ^a	0.508 ± 0.010 ^a	0.498 ± 0.020 ^a	0.2316
Shrimp feed intake						
Mean feed offered (g of feed g of shrimp ⁻¹ day ⁻¹)	0.050 ± 0.00 ^a	0.050 ± 0.00 ^a	0.050 ± 0.00 ^a	0.050 ± 0.00 ^a	0.050 ± 0.00 ^a	1.000
Consumption of AgClNPs (mg of Ag g of shrimp ⁻¹ day ⁻¹)	0.00 ^a	0.64 ± 0.00 ^a	4.30 ± 0.00 ^a	41.38 ± 0.00 ^a	498.56 ± 0.00 ^d	0.0001
Shrimp growth and feed response						
Total weight gain (W %)	7.11 ± 0.8	9.65 ± 0.8	9.59 ± 2.0	7.00 ± 1.6	5.78 ± 3.9	0.1867
Growth rate (% GR)	16.12 ± 0.86 ^b	21.74 ± 0.96 ^c	21.90 ± 2.63 ^c	15.98 ± 2.10 ^b	8.10 ± 1.09 ^a	0.0010
Feed conversion ratio (FCR)	2.18 ± 0.12 ^a	1.61 ± 0.06 ^a	1.65 ± 0.4 ^a	2.28 ± 0.34 ^a	3.55 ± 1.19 ^a	0.1856
Shrimp survival (% S)	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	0.9999

% W = (final mean weight - initial mean weight) / 100
% GR = (final mean weight - initial mean weight) / initial mean weight / 100
FCR = total feed provided (g) / weight gain (g)
% S = (number of organisms live / initial number organisms per tank) / 100

The consumption of feeds supplemented with 1000 and 10000 ppm Ag for 7 days did not affect survival, growth nor feed conversion ratio, but decreased the hepatosomatic index (HPI) significantly. The short-term consumption of Ag/AgCl NPs produced a dose-dependant bioaccumulation of Ag, mainly in the hepatopancreas, followed by cephalothorax cuticle while no significant bioaccumulations was observed in the muscle. The depuration study showed that 88.2% of the NPs accumulated in hepatopancreas had been eliminated in 14 days.



Graph 1. Hepatosomatic index (a) and Ag bioaccumulation in shrimp tissues (b, hepatopancreas; c, cephalothorax cuticle; d, muscle) after consumption for 7 days of feeds supplemented with Ag/AgCl NPs at graded levels (from 0 to 10000 mg NPs per kg feed); in Graphic 1a, letters on top of the mean boxes indicate the absence (a) or presence (b) of a significant difference to the control group (Dunnett test); in graphics 1b, 1c, 1d, letters on top of the columns indicate different homogeneous subsets as determined by a Tukey multiple means comparison test.

CONCLUSIONS

Therefore, this study concludes for the first time that Ag/ gCl NPs synthesized with aqueous extract of cultivated *Ulva clathrata* have potential for the management of Vp AHPND + *in vitro*. In addition, the consumption of low doses of Ag / AgCl (≤100 ppm) NPs by dietary exposure for 7 days does not cause lethal effects in shrimp. Finally, shrimp have a rapid capacity for bioaccumulation and purification, but more studies are required to reinforce the safety of the use of Ag / AgCl against Vp AHPND + infections, as well as to investigate the effects of Ag / AgCl in the immune system and histology, since by obtaining more information, we will provide a broader picture of the necessary measures that should be considered for the application of NP as an antibacterial additive in shrimp feeds.

REFERENCIAS

- Peña-Rodriguez, A., Mawhinney, T. P., Ricque-Marie, D. and Cruz-Suarez, L. E. Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chem.* 129, 491-498 (2011).
- Official Method of Analysis. (AOAC International, 1997)
- OECD Detailed review paper on aquatic arthropods in life cycle and two-generation toxicity tests. *Environment* 135 (2005).
- Guidelines, O., Testing, F. O. R. & Chemicals, O. F. Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure. 1-68 (2011).



Proyecto financiado por CONACYT Ciencia Básica
Clave: 238458